

**Dosiswirkungsuntersuchungen  
bei der  
pränatalen Stimulation der fetalen Lungenreife  
der Ratte durch Betamethason**

**KLAUS WITT**



Aus dem Institut für Experimentelle Chirurgie der

Technischen Universität München.

Direktor: Prof. Dr. med. G. Blümel

Arbeit angefertigt unter Leitung

von Priv.-Doz. Dr. med. vet. Dr. med. habil. Wolf Erhardt

vorgelegt über

Prof. Dr. med. vet. K. Walser

Gynäkologische und Ambulatorische

Tierklinik der Universität München

Lehrstuhl: Prof. Dr. med. vet. M. Rüsse

**Dosiswirkungsuntersuchungen bei der pränatalen Stimulation der  
fetalen Lungenreife der Ratte durch Betamethason**

Inaugural-Dissertation

zur Erlangung der tiermedizinischen Doktorwürde der

Tierärztlichen Fakultät der Ludwig-Maximilians-Universität München

von Klaus Witt

aus

Fürth

München 1986

Gedruckt mit Genehmigung der Tierärztlichen Fakultät  
der Universität München

Dekan: Prof. Dr. H. Zucker  
-----

Referent: Prof. Dr. K. Walser  
-----

Korreferent: Prof. Dr. K. Tempel  
-----

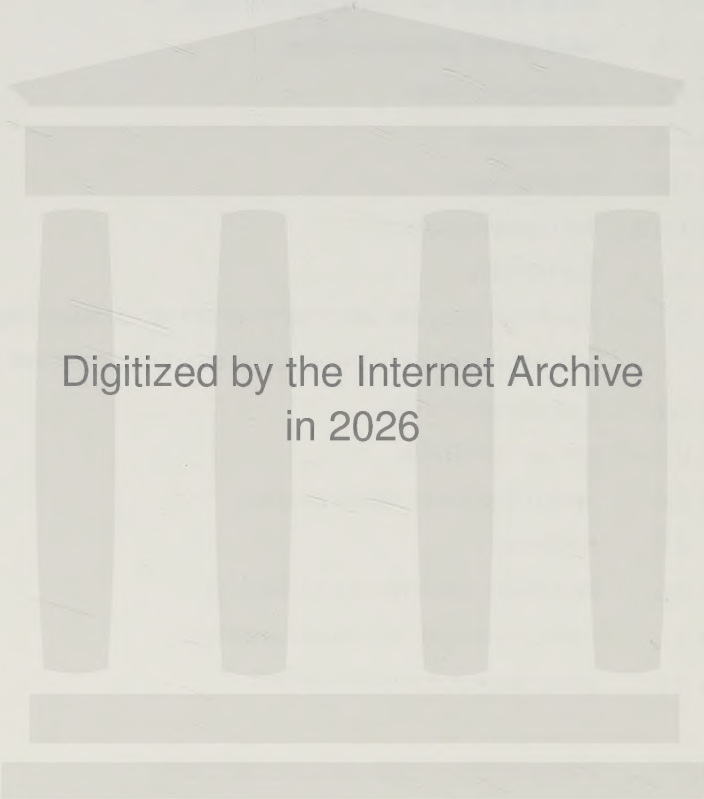
Tag der Promotion: 28. Februar 1986  
-----

**Meiner Mutter und meinem Vater**



## INHALTSVERZEICHNIS

|          |                                                                                                            |       |
|----------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------|
| I.       | EINFÜHRUNG                                                                                                 | S. 1  |
| I.1.     | Das Atemnotsyndrom                                                                                         | S. 1  |
| I.1.1.   | Nomenklatur und Aufgabenstellung                                                                           | S. 1  |
| I.1.2.   | Häufigkeit und Vorkommen                                                                                   | S. 4  |
| I.1.3.   | Klinisches Bild                                                                                            | S. 4  |
| I.1.4.   | Pathologie                                                                                                 | S. 6  |
| I.1.4.1. | Morphologie                                                                                                | S. 6  |
| I.1.4.2. | Pathophysiologie                                                                                           | S. 6  |
| I.2.     | Surfactant                                                                                                 | S. 8  |
| I.2.1.   | Die Bedeutung der alveolären Oberflächenspannung<br>und deren Beeinflussung durch oberflächenaktive Stoffe | S. 8  |
| I.2.2.   | Zusammensetzung                                                                                            | S. 10 |
| I.2.3.   | Ort der Synthese                                                                                           | S. 16 |
| I.2.4.   | Umsatzrate der Phospholipide                                                                               | S. 16 |
| I.2.5.   | Synthese                                                                                                   | S. 17 |
| I.2.6.   | Pharmakologische Beeinflussung                                                                             | S. 18 |
| I.3.     | Wirkungsweise der Glucocorticoide                                                                          | S. 21 |
| I.3.1.   | Nebenwirkungen und Risiken                                                                                 | S. 26 |
| II.      | PROBLEMSTELLUNG UND ZIELSETZUNG                                                                            | S. 28 |
| III.     | EIGENE UNTERSUCHUNGEN                                                                                      | S. 31 |
|          | MATERIAL UND METHODEN                                                                                      | S. 31 |
| III.1.   | Gewinnung und Aufbereitung der Proben                                                                      | S. 31 |
| III.2.   | Biochemische Analysen                                                                                      | S. 32 |



Digitized by the Internet Archive  
in 2026

|         |                                                                                     |       |
|---------|-------------------------------------------------------------------------------------|-------|
| IV.     | ERGEBNISSE                                                                          | S. 36 |
| IV.1.   | Eigene Ergebnisse                                                                   | S. 36 |
| IV.1.1. | Legende                                                                             | S. 36 |
| IV.1.2. | Biochemische Ergebnisse                                                             | S. 36 |
| IV.2.   | Nichteigene Ergebnisse                                                              | S. 42 |
| IV.2.1. | Histologische Ergebnisse                                                            | S. 42 |
| V.      | DISKUSSION                                                                          | S. 48 |
| V.1.    | Prozentanteile des Phosphatidylcholins am Gesamtphospholipid.                       | S. 48 |
| V.2.    | Prozentanteile der einzelnen Phosphatidylcholinspezies am Gesamtphosphatidylcholin  | S. 48 |
| V.3.    | Der Anteil der Gesamtphospholipide bezogen auf das Trockengewicht                   | S. 49 |
| V.4.    | Der Anteil des Dipalmitoylphosphatidylcholins (DPPC) bezogen auf das Trockengewicht | S. 50 |
| V.5.    | Der Anteil der Desoxyribonucleinsäure (DNS) bezogen auf das Trockengewicht          | S. 50 |
| VI.     | ZUSAMMENFASSUNG                                                                     | S. 55 |
| VII     | SUMMARY                                                                             | S. 57 |
| VIII.   | LITERATURVERZEICHNIS                                                                | S. 59 |



## **I. EINFÜHRUNG**

### **1.1. Das Atemnotsyndrom**

#### **1.1.1. Nomenklatur und Aufgabenstellung**

Unter dem Begriff Atemnotsyndrom (ANS) im deutschen bzw. respiratory distress syndrome (RDS) im angelsächsischen Schrifttum werden respiratorische Insuffizienzerscheinungen zusammengefaßt, die letztendlich aus Mangel an Lungensurfactant (Antiatelektasefaktor) zustandekommen.

Die Ursachen des Surfactantmangels können unterschiedlich sein. Adult respiratory distress syndrome (ARDS), auch als akutes Lungenversagen oder Schocklunge bezeichnet, beschreibt die plötzliche exo- oder endogene Induktion der respiratorischen Insuffizienz. (41)

Das frühkindliche RDS, von dem in dieser Arbeit die Rede sein soll, entsteht aus einem primären Surfactantmangel, der durch Unreife des Lungenparenchyms entstanden ist. (79)

Bei drohender Frühgeburt oder bei Indikation zu vorzeitiger Beendigung der Schwangerschaft müssen deshalb Substanzen eingesetzt werden, die geeignet sind, die Lungenreifung perinatal günstig zu beeinflussen.

Eine ganze Reihe mehr oder weniger geeignet scheinender Substanzen, von denen noch eingehend die Rede sein wird, wurden seit geraumer Zeit getestet und eingesetzt. Auf längere Zeit durchsetzen konnten sich allerdings nur einige Cortisonabkömmlinge, die deshalb in den letzten Jahren weltweit bei der Behandlung bzw. Prophylaxe des frühkindlichen

RDS dominieren.

Wegen bestimmter Nebenwirkungen und Risiken, auf die ebenfalls noch genau eingegangen wird, mehrte sich allerdings in jüngster Zeit die Kritik. Das führte zu einer verstärkten Suche nach mindestens ebenso geeigneten, aber weniger toxischen Substanzen.

Im Rahmen eines seit einigen Jahren betriebenen Forschungsprojekts am Rattenmodell, zu dem auch diese Arbeit zählt, kristallisierte sich Carnitin (Gamma-Trimethyl-Amino-Beta-Hydroxybutyrat), ein körpereigenes Betain, als gut geeignete Substanz zur Verbesserung der perinatalen Lungenreife heraus.

Es zeigt sich, daß sowohl Carnitin als auch Glucocorticoide die Lungenreifung günstig beeinflussen, allerdings auf zwei verschiedenen Wegen:

1. Die Glucocorticoide beschleunigen die Differenzierung der Alveolarepithelzellen zu den Typ-II-Zellen, die für Synthese und Speicherung des Surfactant verantwortlich sind.
  2. Das Carnitin wirkt über eine verstärkte Stimulierung der Surfactantsynthese.
- (17,58,87,89,94)

Nun ist es naheliegend, die beiden sich ergänzenden Substanzen miteinander zu kombinieren, um so zu versuchen, ein Optimum an Lungenreifung zu erzielen.

Um die beste Kombinationstherapie zusammenstellen zu können, ist es ratsam, unter den Glucocorticoiddosierungen jene herauszufinden, die eben noch die beschleunigte Differenzierung der Typ-II-Zellen bewirkt, aber möglichst geringe Nebenwirkungen erzeugt, unter den Carnitindosierungen jene, die ein Höchstmaß an Surfactantsynthese stimuliert.

Die ideale Dosis unter den Glucocorticoiddosierungen zu finden, ist Ziel dieser Arbeit, die ideale Carnitindosis zu ermitteln, das Ziel einer Parallelarbeit. (22)

Es besteht also der Wunsch, durch Kombination beider Ideale eine durch ihr Wirkungsoptimum und ihr Nebenwirkungsminimum konkurrenzlose Therapie zu erhalten.

### 1.1.2. Häufigkeit und Vorkommen

In der perinatalen Humanmedizin stellt das frühkindliche Atemnotsyndrom die häufigste Ursache der Säuglingssterblichkeit dar. Amerikanische Studien rechnen mit 40.000 Fällen im Jahr. Bei einem Geburtsgewicht von 1000–1500 g (entsprechend der 27.–31. Gestationswoche) erkranken über 50%, bei 2000–2500 g (34.–36. Schwangerschaftswoche etwa 5% aller Kinder.

Abhängig von dem Grad der Lungenreife sterben 25–50% aller Erkrankten. Nach Angabe der Medizinalstatistik für die BRD betrug der Anteil des idiopathischen Atemnotsyndroms an der perinatalen Mortalität für das Jahr 1972 28,2%, bei einem Geburtsgewicht unter 2500 g sogar 64%. (77)

In der Tiermedizin wird von seltenerem Auftreten gesprochen. Dies hängt aber sicherlich damit zusammen, daß hier keine vergleichbare pädiatrische Intensivmedizin besteht. (34)

### 1.1.3. Klinisches Bild

Meist unmittelbar nach der Geburt oder aber wenige Stunden später stellt sich das klinische Bild folgendermaßen dar:

Das Neugeborene versucht, die insuffiziente Lungenarbeit durch vermehrtes und verstärktes Atmen auszugleichen. Es werden Öffnen des Mundes, Streckung des Kopfes, inspiratorisches Blähen der Nasenflügel, verstärkte Einziehung des Brustkorbes und expiratorisches Stöhnen bemerkt.

Sind vier Stunden post partum zwei der folgenden Kriterien erfüllt,

- 1) Abnorme Einziehung des Brustkorbes
- 2) Atemfrequenz > 60/min. und

3) ohne Phonendoskop hörbares Stöhnen,  
liegt nach REYNOLDS et al. (107) ein RDS vor.

Als Ursache gilt eine meist progrediente, kombinierte Störung der pulmonalen Zirkulation (Perfusionsstörung) und der Alveolenentfaltung (Ventilationsstörung, respiratorische Verteilungsstörung), deren Ursache ein Surfactant-Mangel ist. Im weiteren Verlauf lassen sich Zyanose, Azidose, Hypoglykämie, Hyperkaliämie, Hyperphosphatämie mit Hypokalzämie, Hypoproteinämie und Serum-Harnstoff-Erhöhung finden.

Apnoeattacken häufen sich, und der Tod tritt meist nach 48-72 Stunden ein. Beim Überleben des frühkindlichen Atemnotsyndroms muß mit bleibenden Schäden gerechnet werden.

Da Anamnese und Laborwerte eine absolute Diagnose nicht immer sichern, stützt man sich letztlich beweisend auf das Röntgenbild. Charakteristisch ist der Kontrast zwischen prallgefüllten Gefäßen, Atelektasen und hyalinen Membranen einerseits und geblähten Bronchiolen und Alveolargängen andererseits. (68,112,122)

#### 1.1.4. Pathologie

##### 1.1.4.1. Morphologie

Als morphologische Veränderungen zeigt die betroffene Lunge Atelektasen, überblähte Bronchiolen, Kongestion der Blutgefäße, erweiterte Lymphbahnen, interstitielles Ödem, Hämorrhagien. Hyaline Membranen, die sich aus geronnenem Plasmatrassudat, vermischt mit nekrotischen Alveolarepithelien zusammensetzen, kleiden tapetenartig Alveolen, aber auch Alveolargänge und Bronchiolen aus. Sie können als Spätform des Lungenödems angesehen werden, sind histologisch sichtbare Mucopolysaccharid-Protein-Kondensate und führen durch ihre Anwesenheit zu schweren Diffusionsstörungen. Solche hyaline Membranen können auch beim ausgewachsenen Tier oder Menschen z.B. beim sog. Weideemphysem, der Farmerlunge, der atypischen interstitiellen Pneumonie, der Urämie (sog. urämische Pneumonie), der verminösen Pneumonie und nach Inhalation von reizenden Gasen auftreten. (34,67,122)

##### 1.1.4.2 Pathophysiologie

Ante partum sind Atemwege und Alveolen mit Alveolarflüssigkeit gefüllt, in welcher sich bereits oberflächenaktive Bestandteile befinden. Zu diesem Zeitpunkt überwiegen noch die Alveolarzellen vom Typ II, die für Biosynthese und Speicherung des Surfactants verantwortlich sind. Funktionelle und nutritive Blutversorgung sind noch gering, der Rechts-Links-Shunt besteht.

Zur Anpassung an das extrauterine Leben ist es notwendig, daß die Alveolarflüssigkeit zügig durch Luft ersetzt werden kann.

In welchem Maße und welcher Geschwindigkeit dies geschehen kann, hängt von verschiedenen Umständen ab. Zum einen von der Größe des Flüssigkeitsvolumens und der Weite von Atemwegen und Alveolen,

zum anderen von der Ausgereiftheit und dem Verteilungsmuster der Zellen und der dadurch ermöglichten Flüssigkeitsresorption, sowie vom Surfactantgehalt. Funktionelle und nutritive Blutversorgung verstärken sich zunehmend, Restflüssigkeitsresorption, Surfactantgleichgewicht und Gasaustausch werden dadurch ermöglicht. Der Rechts-Links-Shunt nimmt ab.

In der ausgereiften Alveole sind die Pneumozyten vom Typ I in der Mehrzahl.

Beim frühkindlichen Atemnotsyndrom liegt pathogenetisch ein Mangel an Antiatelektasefaktor (Surfactant) vor, der dazu führt, daß die zu normaler Lungenfunktion notwendige Herabsetzung der Oberflächenspannung in der Alveole ausbleibt. Die Herabsetzung der Oberflächenspannung verhindert das Kollabieren der Alveolen. Durch Verlust oder Mangel an Surfactant kommt es zur Ausbildung von Ödemen, weshalb man den Surfactant auch Antiödemfaktor nennt. Es bilden sich atelektatische Bezirke neben einzelnen durch forcierte Inspiration emphysematisch geblähten Bezirken. Der Antiatelektase- oder Antiödemfaktor kann zusätzlich durch Plasmaproteine, die bei protrahierter Asphyxie die Kapillarmembran durchdringen und sich dann als hyaline Membranen in den Alveolen befinden, inaktiviert werden.

Im Fall des frühkindlichen Atemnotsyndroms bleibt auch der fetale Lungenkreislauf größtenteils bestehen, und ein erhebliches Blutvolumen läuft im Kurzschluß vom rechten zum linken Herzen, ohne eine beatmete Alveolarwand zu berühren. Dies erfolgt entweder über die fetalen Kurzschlüsse (Ductus arteriosus, Foramen ovale) oder über Gefäße atelektatischer Lungenbezirke. Durch die Hypoxie kommt es zur Azidose, diese erhöht den pulmonalen Gefäßwiderstand, wodurch wiederum fetale Kreislaufkurzschlüsse begünstigt werden.

außerdem beeinflusst eine Azidose die Aktivität der Enzyme der Phospholipidsynthese negativ.

Die Lungenkapillaren sind prall mit Blut gefüllt (Splenisation). Durch die Stase kann es zu einer Verbrauchskoagulopathie und dadurch zu erhöhter Blutungsbereitschaft kommen. Im großen Kreislauf ist der Rückfluß zum Herzen erschwert, so daß es z.B. im Gehirn zur Kongestion kommen kann. Intracerebrale Blutungen finden sich bei 4 von 10 Verstorbenen. (7,67,68,117)

## 1.2. Surfactant

### 1.2.1. Die Bedeutung der alveolären Oberflächenspannung und deren Beeinflussung durch oberflächenaktive Stoffe.

Die Oberflächenspannung ist ein physikalisches Phänomen, das an der Grenzfläche zweier verschiedener Medien Gültigkeit hat. Sieht man die Alveolen als mit einem dünnen Flüssigkeitsfilm ausgekleidete Luftbläschen an, haben sie infolge der Oberflächenspannung an der Phasengrenzfläche (Flüssigkeit/Luft) die Tendenz, sich zu verkleinern.

Das Verhalten solcher Bläschen läßt sich beschreiben durch das Gesetz von La Place, nach welchem zwischen der Oberflächenspannung (T), dem Alveolardruck (P) und dem Alveolarradius (r) folgende Beziehung besteht:

$$T = \frac{P \cdot r}{2} \quad \text{bzw.} \quad p' = \frac{2 \cdot T}{r}$$

Nach La Place ist also der Druck umgekehrt proportional dem Radius. Dies erklärt, warum Alveolen mit kleinem Radius entsprechend dem Druckgefälle ihr Gasvolumen nach außen oder an Alveolen mit größerem Radius abgeben. Ohne Reduktion der Grenzflächenspannung durch spezielle Verbindungen würden somit die Oberflächenspannungskräfte dazu führen, daß die verschieden großen Lungenalveolen unterschiedlich stark ventiliert würden. Dies würde für die Inspiration zur Folge haben, daß größere Alveolen zum Schaden ihrer Nachbarschaft übermäßig gebläht würden. Bei der Expiration würden die kleineren Alveolen vermehrt an Größe verlieren, ja sogar ihr Residualvolumen einbüßen. Daher müssen an der alveolären Oberfläche spezielle Verbindungen vorhanden sein (der pulmonale Surfactant), die die Oberflächenspannung abhängig vom Radius verändern. Es waren die Arbeiten von PATTLE (103) und CLEMENTS (25), die erstmals die Anwesenheit von oberflächenaktivem Material (Surfactant) in Lungenflüssigkeit und Gewebeextrakten nachwiesen. Der Surfactant liegt als monomolekularer Film an der Grenzfläche Alveolar-epithel/Luft und ist auf einer dünnen elektrolyt- und proteinhaltigen Flüssigkeitsschicht, der sog. Sub- oder Hypophase gespreitet. Er enthält einen hydrophilen und einen lipophilen Anteil. Der hydrophile Anteil ist in der Hypophase verankert, während der lipophile in das Alveolarlumen ragt. Bei Verkleinerung der Alveole kommt es zu einer Anreicherung bzw. Verdichtung der Phospholipid- moleküle an der Oberfläche mit einer entsprechenden Abnahme der Oberflächen- spannung. Lipide werden in die Subphase abgedrängt und bilden hier eine Art Lipidreserve. Sie können später an die Oberfläche zurückkehren, wenn sie dort bei Vergrößerung der Alveolen benötigt werden. Bei voller Expiration werden die Alveolen durch den

Monolayer offengehalten. Er besteht zu nahezu 90% aus DPPC (Dipalmitoylphosphatidylcholin) (8,28). DPPC stellt sowohl mengenmäßig wie auch funktionell den wichtigsten Surfactantbestandteil dar. Da aber reines DPPC bei Körpertemperatur ca. 8 Stunden benötigt, um sich in Form eines Monolayers an der Oberfläche zu spreiten, kann man vereinfacht die Funktion der anderen Bestandteile des Surfactantkomplexes in einer Beschleunigung des Spreitungsvorganges des Gesamtkomplexes sehen. (71,97)

### 1.2.2. Zusammensetzung

Die Lipidzusammensetzung des Surfactant bei verschiedenen Tierspezies (Hund, Ratte, Kaninchen, Schwein, Schaf) ist ähnlich. Er besteht vor allem aus gesättigten Phosphatidylcholinen. Diese werden zwar in den meisten Körpergeweben gefunden, haben aber lediglich im oberflächenaktiven Material (Surfactant) der Lunge eine so hohe Konzentration. In den Untersuchungsmaterialien wurden zusätzlich andere Phospholipide und geringe Mengen Neutralfette gefunden. Die meisten Fettsäuren der Phosphatidylcholine haben eine Kettenlänge von 16 oder 18 C-Atomen. (26,47)

Der Gehalt an einfach-ungesättigten Phosphatidylcholinen variiert stärker als der der gesättigten. Die variierende Surfactantmenge bei verschiedenen Tierarten ist von der Alveolaroberfläche und der Atemfrequenz der jeweiligen Spezies determiniert. Die Atemfrequenz beeinflusst die Halbwertszeit indirekt proportional. Es ist etwa 2-3mal soviel Reservesurfactant vorhanden wie Monolayer benötigt wird, um die Alveolaroberfläche auszukleiden.

Der Surfactant vom Hund besitzt ein ungewöhnliches einfach-ungesättigtes Phosphatidylcholin. Es hat eine 18 C-Atome lange Fettsäure mit einer cis-äthylen-Bindung am 5. C-Atom. Andere

Phospholipidfraktionen wurden in niedriger Konzentration gefunden, z.B. Phosphatidyläthanolamin, Phosphatidylserin, Phosphatidylinositol und Phosphatidylglycerol. (59,61,62)

Die molekulare Zusammensetzung des Surfactant-Phosphatidylglycerols ist bis jetzt nicht hinreichend untersucht. Dies wäre insofern wichtig, als das gesättigte Phosphatidylglycerol vermutlich wesentlich zu der Fähigkeit des Surfactants, die Oberflächenspannung zu reduzieren, beiträgt. Es bestehen absolut unterschiedliche Aussagen über den Sättigungsgrad des Surfactant-Phosphatidylglycerols im Vergleich zu dem des Phosphatidylcholins.

Neutralfette, hauptsächlich Cholesterol, haben einen Anteil von 5-13 %. Dem Cholesterol werden ebenso wichtige physikochemische Eigenschaften zum Funktionieren des Gesamtkomplexes zugeschrieben. (69,72,95)

Es fällt auf, daß bestimmte Komponenten, die sich in anderen Geweben finden lassen, im Surfactant fehlen oder nur kaum vorhanden sind. So ist z.B. Cholesterolester nur ganz wenig vertreten, obwohl er in einigen Serumlipoproteinen in hoher Konzentration vorliegt. Keines der Lipide im Hundesurfactant besitzt Fettsäuren mit mehr als einer cis-äthylen-Bindung und nur ein geringer Prozentsatz der Phosphatidylcholine besitzt zwei einfachungesättigte Fettsäuren. Bemerkenswerterweise gehört das oberflächenaktive Material zu jenen wenigen Strukturen im Säugetierorganismus, die eine so niedrige Konzentration an zweifachungesättigten Fettsäuren aufweisen.

Zusammenfassend wird der Surfactant angesehen als eine Mischung aus Phospholipiden und Neutrallipiden mit einem ungewöhnlich hohen

Anteil an gesättigten Phosphatidylcholinen. (101,104,108,116)

|                                |           |
|--------------------------------|-----------|
| Phosphatidylcholine            | 74 + 2 %  |
| Lysolecithin und Sphingomyelin | 5 + 2 %   |
| Phosphatidylinositol           | 3 + 0,6 % |
| Phosphatidylserine             | 2 + 0,9 % |
| Phosphatidylglycerol           | 10 + 1 %  |
| Phosphatidylethanolamine       | 4 + 0,9 % |

#### **Surfactant-Lipide beim Beagle (104)**

|                          |              |
|--------------------------|--------------|
| Phosphatidylcholine      | 84,7 + 1,3 % |
| Phosphatidylglycerol     | 8,80 + 0,7 % |
| Phosphatidylethanolamine | 3,00 + 0,6 % |
| Phosphatidylserine       | 0,10 + 0,1 % |
| Phosphatidylinositol     | 2,40 + 0,1 % |

### **Surfactant von Endobronchiallavagen (Kaninchen). (102)**

|                           |        |
|---------------------------|--------|
| Neutrallipide             | 15 %   |
| Phospholipide             | 85 %   |
| Phosphatidylglycerol      | 2,0 %  |
| Phosphatidylethanolamine, |        |
| Phosphatidylserine        | 7,1 %  |
| Phosphatidylinositol      | 3,3 %  |
| Phosphatidylcholine       | 67,1 % |
| Sphingomyelin             | 2,7 %  |

### **Die Phospholipidzusammensetzung des Surfactants vom Schwein. (14)**

|                          |              |
|--------------------------|--------------|
| Phosphatidylcholine      | 68,8 + 1,3 % |
| Phosphatidylglycerol     | 6,7 + 0,3 %  |
| Phosphatidylethanolamine | 9,8 + 0,4 %  |
| Phosphatidylinositol und |              |
| Phosphatidylserin        | 6,1 + 0,5 %  |
| Sphingomyelin            | 5,0 + 0,6 %  |

### **Die Phospholipidzusammensetzung von Lamellarkörperchen aus der Rattenlunge. (39)**

Was die Beteiligung von Proteinen (36) am Surfactant anbelangt, vermutet man aufgrund folgender Beobachtungen die Anwesenheit von speziellen Proteinen, die hinsichtlich Struktur und Funktion mit dem oberflächenaktiven Material in Verbindung stehen:

- 1) In Surfactantpräparationen, die von löslichem Protein gereinigt werden, findet man Apoproteine. (69)
- 2) Diese lassen sich weder in Plasma noch im Serum nachweisen. (71)
- 3) Sie werden in Surfactant gefunden, der von extrazellulären Verunreinigungen befreit ist, um eine Kontamination durch Membranproteine auszuschließen. (74)
- 4) Sie werden in Hundefetensurfactant gegen Ende der Gestation gefunden. Man schließt bakterielle Proteine aus. (63)
- 5) Durch Immunfluoreszenztechnik kann nachgewiesen werden, daß sie an der alveolären Grenzschicht lokalisiert sind. (74)
- 6) Sie zeigen im Surfactant eine 50-fach höhere Konzentration als in Lungengewebe oder Endöbronchiallavage. (69,70)
- 7) Sie werden in der Trachealflüssigkeit von Lammfeten zu einem

Gestationszeitpunkt nachgewiesen, in welchem der Surfactant sezerniert wird. (71,73)

- 8) Die Konzentrationsänderung der Proteine in humanem Fruchtwasser geht Hand in Hand mit der Konzentrationsänderung der Surfactant-Phospholipide. Beide sind abhängig vom Gestationsgrad. (70)

In späteren Arbeiten werden Struktur und Funktion dieser Proteine eingehender untersucht, wobei allerdings zu bemerken ist, daß absolut widersprüchliche Auffassungen darüber bestehen, in welchem Umfang sie bzw. ob sie überhaupt an der eigentlichen Aufgabe des Surfactants beteiligt sind:

CLEMENTS und KING (27) sind der Auffassung, daß im Surfactant des Hundes wenigstens 2 Proteine eine Rolle spielen., Sie unterscheiden ein größeres mit einem Molekulargewicht von 35.000 - 45.000 und ein kleineres mit einem Molekulargewicht von etwa 10.000 - 12.000.

COLACICCO et al. (29) sowie PACIGA et al. (102) beschreiben drei Hauptproteine, nämlich Serum-Albumin, Ig G und Ig A.

Die von CLEMENTS und KING gefundenen Proteine kann COLACICCO nicht bestätigen, schließt allerdings nicht aus, daß die unterschiedlichen Ergebnisse auf verschiedene Bestimmungsmethoden zurückzuführen sind. METCALFE et al. (96) bestreiten eine Beteiligung der Proteine an der Adsorption des Surfactant, sowie an der Herabsetzung der Oberflächenspannung. CLEMENTS und KING (27) sowie KING und MACBETH (73) hingegen schreiben dem von ihnen beschriebenen Apolipoprotein eine physiologische Rolle zu, da nach ihren Untersuchungen der Apolipoprotein-DPPC-Komplex die physikochemischen Eigenschaften erfüllt, die für eine Adsorption an die alveoläre Grenzfläche und die Reduktion der Oberflächenspannung notwendig sind.

### 1.2.3 Ort der Synthese

MACKLIN (93) vermutet als erster, daß die Alveolarzellen vom Typ II ein oberflächenaktives Material produzieren und sezernieren. In autoradiographischen und elektronenmikroskopischen Arbeiten von CHEVALIER und COLLET (24) wurde mit Hilfe von markiertem Cholin gefunden, daß das endoplasmatische Reticulum der Syntheseort des Phosphatidylcholins ist. Von dort gelangt das Phosphatidylcholin über den Golgi-Apparat in die Lamellarkörperchen, die als Speicherort dienen.

Schließlich wird das oberflächenaktive Material in die Subphase ausgeschleust und spreitet als Lipoproteinkomplex an der Luft/Flüssigkeits-Grenze. Unterschiedliche Meinungen bestehen darüber, ob der Lipoproteinkomplex in den Lamellarkörperchen oder erst danach gebildet wird.

### 1.2.4. Umsatzrate der Phospholipide

Eine Reihe von Untersuchungen, die  $^3\text{H}$ -markiertes Palmitat und andere radioaktive Vorläufer verwenden, beobachten die Umsatzrate von Lungengewebe und alveolärem DPPC.

Die Ergebnisse aus diesen Untersuchungen zeigen eine Halbwertszeit von 14 Stunden für das Lungensurfactant-DPPC. Man vermutet, daß mindestens zwei Gewebe-DPPC-Pools bestehen müssen. (99, 130, 134) Vermutlich erfolgt der Abbau der Phospholipide im Lungengewebe auf dem gleichen Weg wie in anderen Geweben. Dafür spricht die Anwesenheit von Phospholipase A, Lipase und Lysophospholipase im Lungengewebe. (1, 4, 49, 50, 100, 136)

Wenig Informationen gibt es bezüglich des Abbaues des Surfactants selbst. Diskutiert werden folgende Möglichkeiten:

- 1) Entfernung durch Alveolarmakrophagen, in denen aktive Phospholipase  $A_1$  und  $A_2$  und Lysophospholipase gefunden werden.
  - 2) Entfernung über den Tracheobronchialbaum.
  - 3) Reabsorption in das Alveolarepithel.
  - 4) Enzymatischer Abbau an Ort und Stelle.
- (44,45,53,99)

#### 1.2.5. Synthese

Die Biosynthese des Surfactants kann nur diskutiert werden an Hand seiner wichtigsten Phospholipide (Phosphatidylcholin und Phosphatidylglycerol), da nicht genügend relevante Daten bezüglich des Apoproteins und der anderen Lipide bekannt sind. Glycerol-3-phosphat stellt den Ausgangspunkt dar. Es entsteht entweder aus Dihydroxyacetonphosphat, einem Zwischenprodukt des Glucose-Abbaus, oder direkt durch Phosphorylierung des Glycerols durch die Glycerolkinase, wobei der Weg über die Glykolyse überwiegt. (137)

Im nächsten Schritt werden zwei Acyl-CoA-Fettsäuren durch die Acyl-CoA-Glycerin-3-phosphat-Acyltransferase auf Glycerin-3-phosphat übertragen, so daß eine Phosphatidsäure entsteht. Eine Phosphatase entfernt den Phosphorsäurerest hydrolytisch und gibt den Weg für die Reaktion mit Cytidinphosphatcholin frei.

Dieses entsteht aus Phosphorylcholin und Cytidintriphosphat. Bei der Übertragung des CDP-Cholins auf das Diglycerid wird der Phosphorylcholinrest mit der primären alkoholischen Gruppe verestert und Cytidinmonophosphat (CMP) wird frei. Es entsteht

Phosphatidylcholin. Dies ist der Kennedy-Syntheseweg. (21,84)

Die Phosphatidsäure kann auch über den von AGRANOFF und HAJRA (2) beschriebenen Weg entstehen. Dabei wird das Dihydroxyacetonphosphat acyliert, mit NADPH reduziert, und das so entstandene 1-Acylglycerol-3-phosphat wird durch erneute Acylierung in die Phosphatidsäure übergeführt. BREMER und GREENBERG (17) beschreiben, daß in der Leber S-Adenosyl-Methionin als Methylondonator dazu dient, Phosphatidylethanolamin durch schrittweise Methylierung in Phosphatidylcholin überzuführen. In der Lunge gibt es zwei mengenmäßig wichtige Stoffwechselwege, um ungesättigtes Phosphatidylcholin in DPPC überzuführen.

In beiden Fällen wird zunächst die meist  $\beta$ -ständige ungesättigte Fettsäure durch Phospholipase A<sub>2</sub> hydrolytisch entfernt.

Bei dem so entstandenen Lyso-Phosphatidylcholin kann jetzt entweder durch spezifische Acyltransferasen Palmitinsäure verestert werden oder durch "Transveresterung" die  $\alpha$ -ständige Palmitinsäure eines zweiten Lyso-Phosphatidylcholins in die  $\beta$ -Stellung des ersten übertragen werden.

#### 1.2.6. Pharmakologische Beeinflussung

Nachdem bereits frühere Untersuchungen zeigen, daß es prinzipiell möglich ist, während der fetalen Entwicklung die Reifungsrate von Organsystemen selektiv zu verändern, versucht man auch die Entwicklungsrate der Lunge zu beeinflussen. (19,20)

In den letzten Jahren wurde eine ganze Reihe von Substanzen bezüglich ihres Einflusses auf die Lungenreifung eingehend geprüft. (31)

### 1) Thyroxin

Die Ergebnisse mehrerer Arbeiten legen eine Beeinflußbarkeit der fetalen Lungenreife durch Schilddrüsenhormone nahe.

Durch Applikation von  $T_4$  und  $T_3$  an Frühgeborene mit einem Geburtsgewicht von weniger als 2200 g und weniger als 37 Schwangerschaftswochen gelang es, deren Sterblichkeit deutlich zu senken. (32,113,123,129,146)

Nach experimenteller Thyroxinbehandlung des Muttertieres stellte HÜTTER (65) einen Anstieg des DPPC-Gehaltes bei Rattenfetenlungen fest, der stärker war als derjenige der Gesamtlipide. Dies könnte auf eine Beschleunigung der Differenzierung der Lungenzellen, auf eine Stimulierung des Deacylierungs-Reacylierungszyklus oder auf beides zurückzuführen sein.

Wegen der möglichen thyreotoxischen Gefährdung der Schwangeren ist allerdings eine klinische Anwendung riskant.

### 2) Bromhexin und Ambroxol (Metabolit VIII)

Ausgehend von der Überlegung, daß eine Substanz, die die sekretorischen Zellen des Tracheobronchialbaumes aktiviert, auch die Typ-II-Zellen der Alveolen beeinflussen müßte, haben sich einige Arbeiten mit dem Bromhexin und seinem Metaboliten Ambroxol beschäftigt. Es wurde unter anderem eine Vermehrung der Pneumocyten vom Typ II und der surfactant-speichernden Granula in fetalen Kaninchenlungen des 29. Gestationstages beschrieben. (33,90,91,92)

Nach KRIEGLSTEINER et al. (78) haben sich die positiven Erwartungen bezüglich des klinischen Einsatzes nicht bestätigt.

### 3) Einige weitere Substanzen

Bei Frühgeburten heroinsüchtiger Frauen kam es auffallend selten zu

einem Atemnotsyndrom. Diese Beobachtung ließ sich durch Tierversuche untermauern. (131)

Berichte über  $\beta$ -mimetische oder, nach Verminderung der Herzwirkung, vorwiegend tokolytische Substanzen, welche die Lungenreife fördern sollen, liegen ebenfalls vor. Es fehlen jedoch weitgehend biochemische und klinische Erfahrungen. (40,60,66,83)

Von besonderem Interesse zeigt sich das Carnitin, dem in den letzten Jahren mehr und mehr Aufmerksamkeit geschenkt wird. Es zeichnet sich durch eine minimale Toxizität, etwa halb so hoch wie diejenige von Kochsalz, und die Fähigkeit, eine signifikante Erhöhung des DPPC-Gehaltes zu induzieren, aus. (144)

Innerhalb des Rattenmodells, in dessen Rahmen auch diese Arbeit zu sehen ist, wird deutlich, daß das Carnitin auf dem Wege einer Stimulation des Fettsäuresynthetasekomplexes wirkt. Es steigert somit auch die Surfactantsynthese. Also ein Weg, der verschieden ist von dem der Wirkungsweise der Glucocorticoide, die ja über eine beschleunigte Differenzierung der Typ-II-Zellen wirken. Mit berechtigter Spannung sieht man deshalb auf noch laufende Untersuchungen, die eine Kombinationstherapie von Glucocorticoiden mit Carnitin hinsichtlich ihres Einflusses auf den Surfactantgehalt untersuchen. (85,114)

#### 4) Glucocorticoide

Die Wirkung von Glucocorticoiden auf die Lungenreife ist bisher am ausführlichsten erforscht.

BUCKINGHAM und AVERY (19) beobachteten als erste das vermehrte Auftreten von Lamellarkörperchen in Alveolarzellen von fetalen Kaninchen nach Gabe von Nebennierenrindenhormonen und werten dies als beschleunigte Zelldifferenzierung. LIGGINS (81) versucht, bei

Schafen durch Glucocorticoide Frühgeburten auszulösen, und stellt dabei als Zufallsbefund fest, daß Lungen unreifer Schaffeten nach Glucocorticoidbehandlung weniger häufig kollabieren, als die von unbehandelten Tieren.

LIGGINS und HOWIE (82) behandeln eine Gruppe von Patientinnen mit Betamethason. Gegenüber einer Kontrollgruppe kann gezeigt werden, daß das RDS-Risiko des Neugeborenen nach Glucocorticoidbehandlung der Mutter von 26 % auf 9 % herabsank.

Aufgrund von Untersuchungen der letzten Jahre geht man heute davon aus, daß die Steigerung des Surfactantgehaltes nach Glucocorticoidbehandlung auf einer vorzeitigen Differenzierung der Typ-II-Zellen beruht. Wegen der risikoreichen möglichen Nebenwirkungen allerdings sind die Glucocorticoide zunehmend in das Kreuzfeuer der Kritik geraten. Deshalb wird nach weniger toxischen Alternativen bzw. Kombination mit solchen Glucocorticoiddosen, die gerade noch eine beschleunigte Differenzierung, aber noch keine unerwünschten Nebenwirkungen erzeugen, gesucht.

### 1.3. Wirkungsweise der Glucocorticoide

Die Glucocorticoide stimulieren, wie alle Steroidhormone, die RNS-Biosynthese im Zellkern und fördern so die Biosynthese eines spezifischen Enzyms (Protein) oder einer Gruppe bestimmter Enzyme, die für einen spezifischen Stoffwechsel verantwortlich ist. Physiologischerweise wird die Sekretion von Hydrocortison (Cortisol) durch Corticotropin (ACTH) aus dem Hypophysenvorderlappen angeregt. Es besteht ein circadianer Rhythmus. Unter normalen Bedingungen werden die Glucocorticoide an ein  $\alpha$ -Globulin, das Corticosteroidbindende Globulin (CBG), Transcortin, gebunden transportiert. Es ist jeweils der freie Teil wirksam. Der

Steroid-Transkordin-Komplex funktioniert als zirkulierendes Reservoir, da in den Nebennierenrinden kaum etwas gespeichert wird. (12,84)

Das Glucocorticoid passiert die Zellmembran und verbindet sich mit einem spezifischen Rezeptorprotein. Im Zytosol glucocorticoid-empfindlicher Gewebe finden sich diese Rezeptoren in vom jeweiligen Entwicklungsstadium abhängiger Anzahl. Der Steroid-Rezeptor-Komplex gelangt daraufhin in den Kern und nimmt reversibel Verbindung zu bestimmten DNS-Abschnitten auf. Dadurch wird die Bildung von messenger-RNS angeregt, welche wiederum in das Zytoplasma wandert und dort an den Ribosomen die Synthese spezifischer Enzyme oder anderer Proteine veranlaßt. Durch deren Einwirken auf den Stoffwechsel entstehen dann die Hormonwirkungen. (12,84)

Die Glucocorticoidwirkung hängt qualitativ und quantitativ von der Natur der bestimmten Verbindung ab. Optimal aktive Glucocorticoide bringen eine optimale Wirkung. Allerdings variiert die Konzentration, die für diese Wirkung benötigt wird, mit den verschiedenen Steroiden und korreliert mit der Affinität zu den oben beschriebenen spezifischen Glucocorticoidrezeptoren.

Mit steigender Konzentration wird die Wirkung von optimal aktiven Steroiden größer. (12,84)

Der zytoplasmatische Steroidrezeptor wird als allosterisches Protein angesehen, d. h. er existiert in vorübergehend aktiven und inaktiven Formen im Gleichgewicht. Das Steroid beeinflußt das Gleichgewicht zwischen den Formen dadurch, daß es an den Rezeptor bindet. Ein optimal aktives Glucocorticoid wird maximal an die aktive Form gebunden. Antiglucocorticoide binden an die inaktive Form des Rezeptors. Dadurch wird die Bindung von Glucocorticoiden kompetitiv gehemmt und die Umlagerung des Rezeptors in die aktive Form

verhindert. (12,84)

Nicht optimal aktive Steroide binden an beide Formen des Rezeptors und bewirken dadurch einen "intermediate" Spiegel an Hormonreaktion. So könnte zum Beispiel durch die Antiglucocorticoidwirkung von Progesteron, das auch im letzten Trimester der Schwangerschaft beträchtlich ansteigt, erklärt werden, warum der Anstieg des freien Cortisols am Ende der Schwangerschaft nicht zu einem Cushing-Syndrom führt. (12,84)

Letztendlich ist noch nicht geklärt, durch welche Mechanismen Glucocorticoide auf die Entwicklung verschiedener Organe günstig einwirken. Man weiß aber, daß sie eine wichtige Rolle bezüglich der Differenzierung und Entwicklung der Gewebe spielen. Sie sind außer für die Surfactantsynthese in der fetalen Lunge, z.B., noch für die Bildung spezifischer Proteine für die sich entwickelnde Retina, das Pankreas und die Milchdrüse von Bedeutung, so daß man sie bezüglich ihres Einflusses auf Wachstum und Entwicklung neben das Cyclo-AMP und die weiblichen und männlichen Geschlechtshormone stellt. (127,135)

Eine beschleunigende Wirkung von verschiedenen Glucocorticoiden auf die Lungenreife bestätigen zahlreiche Untersuchungen an folgenden Tierarten:

Ratte: (51,52,85,108)

Affe: (43,108)

Kaninchen: (9,76,108,109,128,139)

Schaf: (6,106,138)

Es zeigt sich, daß die Möglichkeit, die Lungenreife signifikant zu beschleunigen, bei den verschiedenen Tierspezies nur zu bestimmten Gestationszeitpunkten besteht.

Dies führt man darauf zurück, daß nur in einer bestimmten Entwicklungsphase der Lunge die Steroidhormonrezeptoren der Lungenzellen quantitativ und qualitativ optimal zur Verfügung stehen. Die Anwesenheit von spezifischen Glucocorticoid-bindenden Proteinen konnte zuerst im Zytoplasma und im Kern von Kaninchenfetenlungen und von Schaffetenlungen nachgewiesen werden. Bei Kaninchenfeten sind Dexamethasonrezeptoren zwischen dem 21. Gestationstag und der Geburt, bei Rattenfeten in den letzten 3 Tagen der Gestation, bei Meerschweinchen zwischen dem 35. bis zum 45. Gestationstag gefunden worden. Im Zytosol der menschlichen, fetalen Lungen steigt zwischen der 9. und 17. Schwangerschaftswoche die Konzentration der Bindungsstellen ca. um das 3-fache an.

In der Lunge von gesunden Kaninchen ist post partum im Vergleich zur fetalen Lunge ein niedrigerer Spiegel an Rezeptoren vorhanden, während bei ausgewachsenen Mäusen, Ratten, Meerschweinchen und Hamstern keine Rezeptoren mehr nachweisbar sind. (128)

In Studien mit Kulturen von fetalen Lungenzellen konnte bei Kaninchen vom 20. Tag bis zum 22. Tag eine Wachstumssteigerung, am 24. bis 26. Tag keine Wirkung auf das Zellwachstum und am 28. Gestationstag eine Hemmung des Wachstums durch Cortisol beobachtet werden. Die Differenzierung jedoch ist deutlich beschleunigt. (128)

Am 27. Gestationstag ist in den Lungen von fetalen Kaninchen wenig oder gar kein oberflächenaktives Material nachweisbar. Eine Betamethasonbehandlung von tragenden Kaninchen führt am 26., 27. Tag hingegen zu einem 70%igen Anstieg des Phosphatidylcholins in der alveolären Spülflüssigkeit der fetalen Lungen. (110)

Bei in vivo Studien an fetalen Kaninchen konnten durch eine Steroidbehandlung am 24. Gestationstag bereits am 26. Tag reifere fetale Lungen gesehen werden, als es dem Alter entsprochen hätte. Untersuchungen an Schafen ergaben, daß durch Dexamethasonbehandlung bereits am 108. Tag (nach 2-4tägiger Verabreichung) oberflächenaktives Material in den fetalen Lungen nachweisbar ist. Im Trachealsekret der Feten kommt es außerdem nach Dexamethasonbehandlung zwischen dem 108. und 120. Tag gegenüber Kontrollen zu einem 4-fachen Anstieg des oberflächenaktiven Materials. Nach dem 135. Tag ist die Menge des oberflächenaktiven Materials im Trachealsekret noch 1,8mal so hoch. (9,76,109,139)

Im Unterschied zu den beschriebenen Tierspezies reagiert die humane Fetenlunge schon in einem frühen Gestationsalter auf Corticostéroide. (38,127)

Dies läßt die Vermutung zu, daß bei der Ausbildung des RDS des Neugeborenen fehlende Corticosteroidrezeptoren kein wesentlicher Faktor sein können.

Bei Einsatz von Steroiden in der Klinik zur RDS-Prophylaxe kann angenommen werden, daß um die 32. Gestationswoche und danach mit einem positiven Ergebnis der Behandlung gerechnet werden kann. (37,124)

Sowohl über das physiologische Verhalten der Enzyme des Kennedy-Syntheseweges (s. S. 16) während der Gestation, als auch über ihre Beeinflußbarkeit durch Glucocorticoide liegen absolut kontroverse Berichte vor. Viele Untersuchungen lassen aber die Vermutung zu, daß Corticosteroide die normale Lungenentwicklung beschleunigen, daß aber über diesen Rahmen hinaus keine weitere Anhebung der Surfactantproduktion zu erreichen ist. Unterstrichen wird dies durch die Beobachtung, daß bei Streßschwangerschaften ein erhöhter

Cortisolspiegel und häufig auch eine Beschleunigung der Lungenreife vorliegt. Sogar die Injektion von Kochsalz an Feten erhöht den DPPC- und den PC-Gehalt der fetalen Lungen. (77,78,108,109,110,111)

### 1.3.1 Nebenwirkungen und Risiken

Hinreichend bekannt ist in der Tiermedizin das Risiko eines Abortes nach Behandlung durch Glucocorticoide gegen Ende der Trächtigkeit (Stute!).

Zahlreiche Arbeiten lassen sich in der Literatur finden, die sich mit eventuellen und tatsächlichen unerwünschten Nebenwirkungen der Glucocorticoide in der antepartalen Anwendung beschäftigen.

Es wurde bei neugeborenen Mäusen auf einen durch Cortisolbehandlung bedingten Zwergwuchs hingewiesen. Einige Autoren berichten von Entwicklungsstörungen, hauptsächlich bei Thymus und Milz. Der beobachtete Zwergwuchs wurde verglichen mit jenem, der nach Thymektomie auftritt. (16,42,118,121)

Mehrere Mechanismen, die eine Wachstumshemmung bewirken, werden diskutiert:

- 1) Die Unterdrückung der Freisetzung des Wachstumshormon-Releasing-Faktors. (115)
- 2) Direkte Unterdrückung der Zellmitose. (143)
- 3) Interferenz mit Chondrozytenwachstum und -differenzierung. (118)
- 4) Verlust von Thymus-Wachstumsfaktor. (131)
- 5) Vermehrter Verbrauch von Aminosäuren durch die Leber. (132)
- 6) Erhöhte Infektionsbereitschaft. (119,125)

Ausgehend von der Tatsache, daß Corticoide in der fetalen Lunge eine

beschleunigte Zellreifung bewirken, wurde der Einfluß von Cortisolgaben auf Größe und Anzahl der Lungenzellen untersucht. (23,105)

Besondere Aufmerksamkeit verdienen die Arbeiten, die sich mit der Entwicklung des ZNS nach Steroidbehandlung neugeborener Tiere beschäftigen. (30,57,119,120)

HOWARD (63) implantierte Mäusen Corticoidpellets, die kontinuierlich Steroide freigaben, und zwar in Dosen, welche denen nach ACTH-Gabe entsprachen. Trotz dieser relativ geringen Dosen wog nach 7 Tagen das Gehirn der behandelten Tiere um 24% weniger. Die für diesen Zeitraum normale Zunahme an Gehirn-DNA war blockiert. Das Gehirnwachstum, vor allem das des Kleinhirns, war bis ins Erwachsenenalter vermindert. Motorische Störungen waren nachweisbar. (64)

Weiterhin ist eine Schwäche des Immunsystems zu beobachten, die auf eine "medikamentöse Thymektomie" zurückgeführt wurde. (16)

Bei Ratten und Kaninchen, die gegen Ende der Trächtigkeit mit Glucocorticoiden behandelt wurden, war die Zahl mazerierter und totgeborener Feten erhöht. (54,98)

WELLMAN und VOLK (142) fanden ein reduziertes Placentawachstum wie auch beschleunigte Alterungsprozesse der Placenta.

WONG (145) führt diese Beobachtung auf einen insuffizienten Mutter-Fet-Glucosetransfer zurück. Der Inselzellapparat im Pankreas von Ratte und Kaninchen, welche ACTH oder Corticoide erhielten, zeigte beschleunigte Reife und Degeneration. (80)

Die Auswirkungen auf so viele verschiedene Organsysteme erklären sich durch die Stimulation einer großen Zahl von Enzymen durch hohe Glucocorticoidspiegel. Auffallend ist, daß trotz der großen Zahl an Berichten über Glucocorticoidnebenwirkungen bei fetalen und neugeborenen Tieren über die menschliche Spezies nur sehr wenige

Untersuchungen diesbezüglich vorliegen.

Seit Beginn der 50er Jahre wurde eine ganze Reihe von Krankheiten bei neugeborenen Kindern mit Glucocorticoiden behandelt, ohne daß man auf ungünstige Nebenwirkungen geachtet hätte.

Bei einer Zahl von 264 Kindern, deren Mütter mit Corticoiden behandelt wurden, berichten BONGIOVANNI und Mc FADDEN (15) von 8 Totgeburten, 1 Abort und 15 Frühgeburten.

WARRELL und TAYLOR (140) vergleichen eine Gruppe von 34 Müttern, die während der Schwangerschaft einer Prednisolonbehandlung unterzogen wurden, mit einer – trotz ähnlicher Erkrankungen – unbehandelten Gruppe. Sie fanden ein erhöhtes Risiko bezüglich Placentainsuffizienz und Totgeburten für die behandelte Gruppe. GREEN (56) berichtet von 6 fetalen oder perinatalen Todesfällen bei 16 Schwangeren mit Cushing-Syndrom.

Als spezielles Risiko für die Mutter hat die Begünstigung der Entstehung und Ausbreitung von Infektionen zu gelten.

## II. PROBLEMSTELLUNG UND ZIELSETZUNG

Hinsichtlich ihrer Wirkung auf die Lungenreifung sind die Glucocorticoide von allen Pharmaka bisher am ausführlichsten erforscht. Da ihre Anwendung mit einer Reihe von riskanten Nebenwirkungen verknüpft ist, möchten die Untersuchungen vorliegender Arbeit dazu beitragen, Dosierungen zu ermitteln, die es erlauben, die positiven Wirkungen zu erhalten und die unerwünschten Nebenwirkungen auf ein Minimum zu reduzieren.

Im Rahmen der Suche nach weniger riskanten Substanzen, die sich

natürlich ebenso zur antepartalen Beschleunigung der Lungenreifung eignen sollen, hat sich das Carnitin als äußerst geeignet erwiesen. Nach Antepartum-Behandlung mit L-Carnitin bei trächtigen Ratten steigen sowohl der Gesamphospholipidanteil, als auch der DPPC-Anteil in den fetalen Lungen. (88)

Wie schon erwähnt, besitzt das Carnitin außerdem eine nur halb so hohe Toxizität wie Kochsalz. (85,133,144)

Im Gegensatz dazu steigt nach Betamethasonbehandlung der DPPC-Anteil in den fetalen Lungen zwar auch, während sich aber der Gesamphospholipidanteil nicht in dem Ausmaß erhöht.

Die günstige Wirkung von Betamethason auf die Lungenreifung führt man auf eine beschleunigte Differenzierung der Pneumocyten vom Typ II zurück. Sie sind verantwortlich für die Surfactantsynthese und -speicherung. (5)

Da ein hoher DPPC-Anteil an den Phosphatidylcholinen für diese Zellen charakteristisch ist, erklärt man sich die beschriebenen Effekte durch eine verstärkte Proliferation der Typ-II-Zellen im Vergleich zu den anderen Lungenzellen.

Verglichen damit zeigt das Carnitin keinen Einfluß auf die Zeit der Lungenreifung. Der Anstieg des DPPC ist die Folge eines Anstieges der Gesamphospholipide aufgrund der stimulierenden Wirkung des Carnitins auf den Fettsäuresynthetasekomplex. (46) Daraus ergibt sich die Aufgabenstellung vorliegender Arbeit. Sie soll diejenige Glucocorticoiddosis ermitteln, die eben noch eine beschleunigte Differenzierung der Typ-II-Zellen bewirkt, aber keine oder möglichst wenig unerwünschte Nebenwirkungen. Eine zur gleichen Zeit - auch innerhalb dieses Rattenmodelles - durchgeführte Parallelarbeit (22) soll diejenige Carnitindosis ermitteln, die zu einer optimalen Surfactant-Synthese führt. Verwendet man nämlich darüberhinaus noch

höhere Dosen Carnitin, fällt der Surfactant (DPPC)-Gehalt wieder ab, was auf eine Enzymhemmung zurückgeführt wird.

Wie also unter gleichen Untersuchungsbedingungen in der gleichen Untersuchungsreihe anhand biochemischer und morphologischer Parameter festgestellt wird, kann durch Carnitingabe zwar eine Anhebung des Phospholipidspiegels, des Lecithinspiegels und des DPPC-Spiegels in den fetalen Lungen erreicht werden, aber keine vorzeitige Differenzierung der Typ-II-Zellen. (22,88,147)

Aufgrund der unterschiedlichen Wege, über die Carnitin und Betamethason den DPPC-Gehalt der fetalen Lunge anheben, ist es wie gesagt naheliegend, beide Substanzen zu kombinieren. Dieses Konzept hat sich in der Zwischenzeit auch in der Klinik bewährt. (114)

Es gilt als gesichert, daß für eine vorzeitige Differenzierung der Typ-II-Zellen geringere Betamethasondosierungen erforderlich sind, als für eine angestrebte Stimulierung der Enzyme der PC-Synthese. (114,147)

Da die PC-Synthese viel ungefährlicher mit Carnitin angeregt wird, kann man die Betamethasondosis bei einer Kombinationsbehandlung auf jene Menge beschränken, die für eine vorzeitige Differenzierung der Typ-II-Zellen gerade noch ausreicht. (88)

Das Ziel der vorliegenden Arbeit ist es daher, anhand von biochemischen Kriterien jene Dosierung von Betamethason zu finden, die bei geringsten Nebenwirkungen noch eine vorzeitige Differenzierung der Typ-II-Zellen bewirkt.

Dazu wird folgendermaßen vorgegangen:

### III. EIGENE UNTERSUCHUNGEN

#### MATERIAL UND METHODEN

##### III.1. Gewinnung und Aufbereitung der Proben

Es werden insgesamt 55 gravide Wistarratten vom Stamm Chbb Thom mit einem Durchschnittsgewicht von ca. 300 g untersucht. Die physiologische Tragezeit beträgt 23 Tage. Die Tiere werden in Ketamin Xylazin-Anästhesie am 21. Gestationstag per sectionem caesaream entbunden. Die präpartale Injektionsbehandlung erfolgte jeweils am 17., 18., 19. und 20. Tag. Es werden folgende Gruppen, unterschieden:

- a) 0,02 mg Betamethason pro kg KGW \* i.p.
- b) 0,05 mg Betamethason pro kg KGW \* i.p.
- c) 0,10 mg Betamethason pro kg KGW \* i.p.
- d) 0,20 mg Betamethason pro kg KGW \* i.p.
- e) 1 ml physiologische Kochsalzlösung intraperitoneal als Kontrollgruppe

Nach Laparatomie am 21. Tag post conceptionem (Medianschnitt) werden die Feten entnommen, gezählt und gewogen. Feten mit Mißbildungen werden verworfen, aber registriert. Unmittelbar darauf werden die Fetenlungen entnommen und ebenfalls gewogen. Von jeweils einer Fetenlunge wird das Trockengewicht nach 24 Stunden bei 104 Grad C im Muffelofen bestimmt.

Die restlichen Lungen werden in einem Folchgemisch (Chloroform/Methanol 2:1) mittels Ultra-Turrax homogenisiert und für die Dauer von 4 Minuten in ein Ultraschallbad gestellt. 24 Stunden später wird das Gemisch abgefiltert und mit 20 Volumenprozent Aqua bidest. vermischt. Nach weiteren 24 Stunden wird die obenaufstehende

\* Betamethason = Celestan ® Byk, Essen, München

wäßrige Phase abgesaugt und der Rest mittels Rotationsverdampfer zur Trockene eingengt. Die Lipide werden mit 8 ml Chloroform aufgenommen.

### III.2. Biochemische Analysen

Die Proben werden erneut eingengt und mit 2 ml Chloroform aufgenommen. Danach führt man die photometrische Phospholipidbestimmung nach Bartlett (10) durch.

Für die sich anschließende Dünnschichtchromatographie werden die Proben durch den CAMAG LINOMAT III auf DC-Alufolien Kieselgel 60 (Art. 5553 E. Merck, Darmstadt) aufgetragen. Als Laufmittel dient ein Gemisch aus Chloroform, Methanol und 1%iger KCl-Lösung (43:47:4).  
(86)

Nach 90 Minuten wird die Platte aus dem Laufmittel genommen und unter Stickstoff getrocknet. Der Prozentanteil des Phosphatidylcholins am Gesamt-Phospholipid wird durch reflektions-densitometrische Auswertung der Phospholipidbanden bestimmt.

Der Referenzstreifen wird abgeschnitten, mit Molybdätophosphorsäure Sprühreagenz 3,5 % (Art. 531 Merck, Darmstadt) besprüht und bei 180° C 10 Minuten lang gefärbt.

Die den einzelnen Phospholipiden entsprechenden Banden kratzt man von der Platte ab, nimmt sie in ein 50 ml Chloroform/Methanol-Gemisch 1:1 auf und rührt sie 4 Stunden lang unter Stickstoff mit einem Magnetrührer. Das Silicagel wird danach mit einer Sinter-Nutsche entfernt, zweimal gewaschen, unter Stickstoff eingengt und in 5 ml Schraubröhrchen übergeführt, erneut zur Trockene eingengt, mit 3 ml 0,1 m TRIS-Puffer und 0,02 mol/l  $\text{CaCl}_2$  versetzt und 20 Sekunden lang beschallt. Hiernach werden 10 U

Phospholipase C aus *Bacillus cereus* Grad II (Kontr. Nr. 1312116 Boehringer, Mannheim) und 3 ml Diäthyläther (Merck, Darmstadt) zugegeben. Anschließend inkubiert man das Gemisch bei 37° C 30 Minuten lang und schüttelt es im Turbula Schüttler 1 1/2 Stunden. Die Ätherphase wird abgehoben, der Vorgang des Ausschüttelns noch viermal wiederholt, das restliche Wasser mit Methanol entfernt, die vereinigten Ätherphasen unter Stickstoff zur Trockene eingeeengt und letztlich in Chloroform aufgenommen. Die Probe wird in ein Reaktionsgefäß überführt, erneut zur Trockene eingeeengt, in 20 µl Pyridin aufgenommen, mit 8 ml Hexamethyldisilazan und 4 µl Chlortrimethylsilan eine Stunde lang bei 80° C zur Reaktion stehen gelassen. Die anschließend erhaltenen Trimethylsilylätherderivate der Diglyceride verwendet man direkt für die gaschromatographische Analyse, der einzelnen

Phosphatidylcholinspezies (s. Tab. 1), wobei der Dani 3800 Gaschromatograph HR PTV zur Anwendung kommt, dem der auswertende Computer Laboratory Data Control 301 Computer Integrator angeschlossen ist.

Der Anteil des Dipalmitoylphosphatidylcholins (DPPC) in mg/g Trockengewicht wird dadurch errechnet, daß man vorher eine genau definierte Menge (100 µg) Dimyrystoilphosphatidylcholin dazugibt. Die Flächenberechnung des DPPC-Peaks und die Flächenberechnung des Dimyrystoilphosphatidylcholin-Peaks werden dann gegeneinander in Beziehung gesetzt, so daß auf die Menge DPPC geschlossen werden kann. (86)

Der DNS-Anteil in mg/g Trockengewicht wird kolorimetrisch nach der Methode von Gold bestimmt. (55)

Die statistische Auswertung erfolgt nach dem least significant difference (LSD) Test, der die Vergleiche aller Gruppen untereinander

beeinhaltet. (141)

Die Verwendung von Gaskapillarsäulen mit nichtpolarer Silikonphase statt konventioneller Säulen ermöglicht sowohl eine Zeitersparnis, als auch eine Verbesserung der Trennung. Dadurch ist es möglich, die 3-sn-phosphatidylcholin-spezies mit der gleichen Anzahl von C-Atomen sowohl hinsichtlich der 1,2- und 1,3-Isomeren, als auch hinsichtlich des Sättigungsgrades zu trennen.

Es werden also folgende Parameter bestimmt:

- 1) PC-30 = Phosphatidylcholin-spezies mit insgesamt 30 C-Atomen in den Fettsäureketten (Tab. 2).
- 2) PC-32 = Phosphatidylcholin-spezies mit insgesamt 32 C-Atomen in den Fettsäureketten (Tab. 2).
- 3) PC-34 = Phosphatidylcholin-spezies mit insgesamt 34 C-Atomen in den Fettsäureketten (Tab. 2).
- 4) PC-36 = Phosphatidylcholin-spezies mit insgesamt 36 C-Atomen in den Fettsäureketten (Tab. 2).
- 5) PC-38 = Phosphatidylcholin-spezies mit insgesamt 38 C-Atomen in den Fettsäureketten (Tab. 2).
- 6) 16:0/16:1 = Phosphatidylcholin-spezies mit insgesamt 32 C-Atomen in den Fettsäureketten und einer ungesättigten Bindung in der  $\beta$ -ständigen Fettsäurekette (Tab. 2).
- 7) 16:1/16:0 = Phosphatidylcholin-spezies mit insgesamt 32 C-Atomen in den Fettsäureketten und einer ungesättigten Bindung in der  $\alpha$ -ständigen Fettsäurekette (Tab. 2).
- 8) DPPC = Phosphatidylcholin-spezies mit insgesamt 32 C-Atomen in den Fettsäureketten mit nur gesättigten Bindungen in der  $\alpha$ -ständigen wie auch in der  $\beta$ -ständigen Fettsäurekette. (16:0/16:0) (Tab. 2).

- 9) Prozentanteil des Phosphatidylcholins (PC) am Gesamt-Phospholipid (PL) (Tab. 1).
- 10) Der Anteil der Gesamtphospholipide (PL) in mg/g Trockengewicht (Tab. 3).
- 11) Der Anteil des Dipalmitoylphosphatidylcholins (DPPC) in mg/g Trockengewicht (Tab. 4).
- 12) Der Anteil der Desoxyribonnucleinsäure (DNS) in mg/g Trockengewicht (Tab. 5).

Für die histologische Untersuchung werden – wie für die DNS-Bestimmungen – von jeder Fetenlunge sofort bei Entnahme Gewebestückchen in flüssigem Stickstoff eingefroren. (147)

#### IV. ERGEBNISSE

##### IV.1. Eigene Ergebnisse

###### IV.1.1. Legende

Gruppe A: Kontrollen (NaCl)

Gruppe B: Betamethason 0,02 mg/kg KGW

Gruppe C: Betamethason 0,05 mg/kg KGW

Gruppe D: Betamethason 0,10 mg/kg KGW

Gruppe E: Betamethason 0,20 mg/kg KGW

x = Mittelwerte

± SD = Standardabweichungen

n = Anzahl der untersuchten Proben. Wenn die Zahl n für die gleiche Gruppe in einer anderen Tabelle manchmal nicht die gleiche ist, so kommt es daher, daß vereinzelt Proben aus technischen Gründen ausgefallen sind.

\* = signifikant höher oder niedriger ( $p \leq 0,05$ )

##### IV.1.2. Biochemische Ergebnisse

Prozentanteil des Phosphatidylcholins (PC) am Gesamtphospholipid

| Gruppe | n | x    | ±SD  |
|--------|---|------|------|
| A      | 8 | 34,0 | 1,7  |
| B      | 7 | 37,8 | 2,4* |
| C      | 8 | 37,0 | 1,8* |
| D      | 7 | 36,6 | 2,0* |
| E      | 5 | 37,2 | 3,6* |

Tabelle 1

Es ist ein Anstieg des Prozentanteils des Phosphatidylcholins am Gesamtphospholipid nach Betamethasonbehandlung der Muttertiere zu erkennen.

Die mit Betamethason behandelten Gruppen unterscheiden sich signifikant von der Kontrollgruppe ( $p < 0,05$ ).

Innerhalb der Gruppen B bis E besteht kein signifikanter Unterschied.

| Gruppe      | n  | PC-30<br>$\bar{x}$ | SD | 16:0/16:1<br>$\bar{x}$ | SD | 16:1/16:0<br>$\bar{x}$ | SD | DPPC<br>$\bar{x}$ | SD | PC-32<br>$\bar{x}$ | SD | PC-34<br>$\bar{x}$ | SD | PC-36<br>$\bar{x}$ | SD | PC-38<br>$\bar{x}$ | SD |
|-------------|----|--------------------|----|------------------------|----|------------------------|----|-------------------|----|--------------------|----|--------------------|----|--------------------|----|--------------------|----|
| (NaCl)      | 9  | 4,6 $\pm$ 0,8 §    |    | 4,4 $\pm$ 0,4 §        |    | 6,7 $\pm$ 0,7 §        |    | 19,5 $\pm$ 2,0    |    | 30,6 $\pm$ 1,8 §   |    | 37,8 $\pm$ 2,7     |    | 19,8 $\pm$ 1,5     |    | 7,4 $\pm$ 2,3      |    |
| (Beta 0,02) | 9  | 4,0 $\pm$ 0,8      |    | 4,3 $\pm$ 0,3 §        |    | 5,3 $\pm$ 2,3          |    | 17,7 $\pm$ 1,3    |    | 27,4 $\pm$ 1,5     |    | 39,9 $\pm$ 2,9 §   |    | 21,2 $\pm$ 2,0     |    | 7,4 $\pm$ 3,5      |    |
| (Beta 0,05) | 12 | 3,8 $\pm$ 0,5      |    | 4,0 $\pm$ 0,3          |    | 5,5 $\pm$ 0,7          |    | 18,5 $\pm$ 1,4    |    | 28,0 $\pm$ 1,8     |    | 37,4 $\pm$ 2,5     |    | 21,6 $\pm$ 1,4 §   |    | 8,6 $\pm$ 2,9      |    |
| (Beta 0,10) | 9  | 4,6 $\pm$ 0,9 §    |    | 4,0 $\pm$ 0,3          |    | 7,0 $\pm$ 1,9 §        |    | 21,1 $\pm$ 2,4 §  |    | 32,0 $\pm$ 3,4 §   |    | 35,5 $\pm$ 3,3     |    | 19,7 $\pm$ 1,3     |    | 7,9 $\pm$ 1,8      |    |
| (Beta 0,20) | 7  | 4,0 $\pm$ 0,9      |    | 3,9 $\pm$ 0,4          |    | 6,0 $\pm$ 1,7          |    | 18,4 $\pm$ 3,5    |    | 27,9 $\pm$ 3,6     |    | 36,1 $\pm$ 2,2     |    | 21,3 $\pm$ 2,6     |    | 10,0 $\pm$ 2,8     |    |

§ bedeutet signifikant höher oder niedriger ( $p < 0,05$ )

## PC-30:

Gruppe B (Beta 0,02) und Gruppe C (Beta 0,05) sind signifikant niedriger als Gruppe A (NaCl), aber auch als Gruppe D (Beta 0,10). ( $p < 0,05$ ).

Gruppe E (Beta 0,10) zeigt überhaupt keinen signifikanten Unterschied zu einer anderen Gruppe.

## 16:0/16:1:

Gruppe C (Beta 0,05), Gruppe D (Beta 0,10) und Gruppe E (Beta 0,20) zeigen signifikant niedrigere Werte als die Kontrollgruppe und die Gruppe B (Beta 0,02) mit der niedrigsten Betamethasondosierung ( $p < 0,05$ ).

## 16:1/16:0:

Gruppe B (Beta 0,02) und Gruppe C (Beta 0,05) zeigen in ihren Werten eine signifikante Erniedrigung gegenüber denen von Gruppe A (NaCl), aber auch Gruppe D (Beta 0,10) ( $p < 0,05$ ).

Gruppe E (Beta 0,20) zeigt keinen signifikanten Unterschied zu einer anderen Gruppe.

## DPPC:

Gruppe D (Beta 0,10) unterscheidet sich durch eine signifikante Erhöhung von Gruppe B (Beta 0,02), Gruppe C (Beta 0,05) und Gruppe E (Beta 0,20) ( $p < 0,05$ ), nicht jedoch von der Kontrollgruppe.

PC-32:

Die Werte der Kontrollgruppe und der Gruppe D (Beta 0,10) sind signifikant höher als die der Gruppe B (Beta 0,02), Gruppe C (Beta 0,05) und Gruppe E (Beta 0,20) ( $p < 0,05$ ).

PC-34:

Gruppe B (Beta 0,02) ist signifikant erhöht ( $p < 0,05$ ), gegenüber den anderen Gruppen.

PC-36:

Gruppe C (Beta 0,05) ist signifikant höher zur Kontrollgruppe und zur Gruppe D (Beta 0,10) ( $p < 0,05$ )

In den Gruppen B (Beta 0,02) und E (Beta 0,20) bestehen keine signifikanten Unterschiede.

PC-38:

Hier unterscheiden sich keine zwei Gruppen untereinander signifikant.

Der Anteil der Gesamphospholipide (PL) in mg/g Trockengewicht.

| Gruppe | n  | x    | ±SD   |
|--------|----|------|-------|
| A      | 9  | 63,5 | 10,4  |
| B      | 9  | 67,0 | 8,3   |
| C      | 10 | 72,8 | 12,2  |
| D      | 9  | 78,5 | 16,4* |
| E      | 6  | 73,9 | 14,4  |

Tabelle 3

Bei Gruppe D (Beta 0,10) liegt ein signifikanter Anstieg ( $p < 0,05$ ) gegenüber der Kontrollgruppe vor. Die anderen Gruppen unterscheiden sich nicht signifikant voneinander (s. Abb. 1).

Der Anteil des Dipalmitoylphosphatidylcholins (DPPC) in mg/g Trockengewicht.

| Gruppe | n  | $\bar{x}$ | $\pm SD$ |
|--------|----|-----------|----------|
| A      | 9  | 5,8       | 0,7      |
| B      | 9  | 6,1       | 0,9      |
| C      | 12 | 5,8       | 1,2      |
| D      | 9  | 7,9       | 2,8*     |
| E      | 5  | 7,0       | 2,9      |

Tabelle 4

Gruppe D (Beta 0,10) liegt signifikant höher ( $p < 0,05$ ) als die Kontrollgruppe, die Gruppe B (Beta 0,02) und die Gruppe C (Beta 0,05). Durch die doppelte Dosierung in der Gruppe E (Beta 0,20) zeigt sich keine weitere Steigerung (s. Abb. 2)

Der Anteil der Desoxyribonucleinsäure (DNS) in mg/g Trockengewicht.

| Gruppe | n | $\bar{x}$ | $\pm SD$ |
|--------|---|-----------|----------|
| A      | 7 | 42,1      | 6,5      |
| B      | 6 | 39,9      | 6,1      |
| C      | 8 | 30,5      | 5,5*     |
| D      | 7 | 27,8      | 5,3*     |
| E      | 5 | 27,8      | 5,3*     |

Tabelle 5

Von der Gruppe C (Beta 0,05) ab liegen alle Werte signifikant niedriger ( $p < 0,05$ ) als in der Kontrollgruppe und der Gruppe B (Beta 0,02) (s. Abb. 3).

## IV.2. Nichteigene Ergebnisse

### IV.2.1. Histologische Ergebnisse

In etwa bestätigt werden die biochemischen Ergebnisse durch eine angeforderte histologische Untersuchung. (147)

Generell muß man aber einräumen, daß der Zeitpunkt der Fetenlungenentnahme vom Histologen als etwas zu früh bezeichnet wird, um schon eine deutliche Differenzierung der Lungenalveolarzellen in Typ I und Typ II vornehmen zu können.

#### Lichtmikroskopie:

Die Präparate der Gruppen B (Beta 0,02) und C (Beta 0,05) unterscheiden sich nicht wesentlich von denen der Gruppe A (NaCl, Kontrolle). Erst in Gruppe D (Beta 0,10), besonders aber in Gruppe E (Beta 0,20), findet der Histologe Anzeichen einer beschleunigten Differenzierung. Lamellar bodies sind lichtmikroskopisch nicht zu identifizieren.

#### Elektronenmikroskopie:

In Gruppe B (Beta 0,02) zeigen sich keine Unterschiede zur Kontrolle, allenfalls ein Hinweis auf Ribosomenvermehrung.

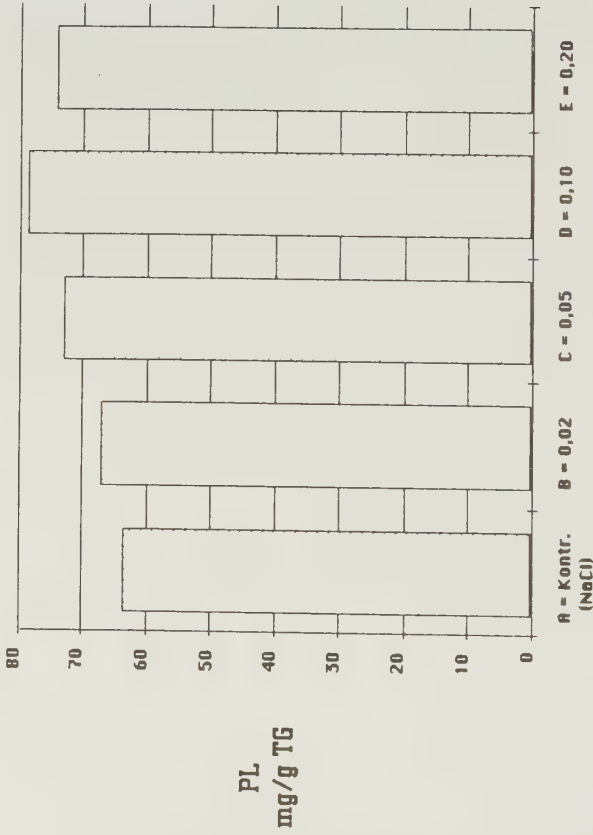
In Gruppe C (Beta 0,05) ist die Zahl der Vorläufer von lamellar bodies gesteigert. Sonst sind keine morphologischen Veränderungen der Zellen zu sehen.

In Gruppe D (Beta 0,10) findet der Histologe reichlich lamellar bodies.

Der Differenzierungsgrad der Epithelzellen wird allerdings als sehr niedrig bewertet.

In Gruppe E (Beta 0,20) finden sich nochmals reichlich lamellar bodies, wobei Vorläuferformen nunmehr kaum noch zu sehen sind. Obwohl Anzeichen einer weiter fortgeschrittenen Zellreifung vorhanden sind, gibt es immer noch keine Differenzierungsmöglichkeit zwischen Typ-I- und Typ-II-Zellen.

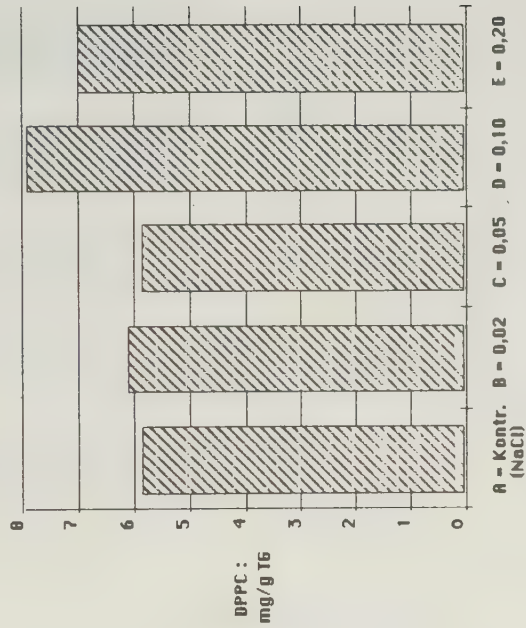
**Der Anteil der Gesamtlipophile (PL) in mg/g  
Trockengewicht (TG)**



**Betamethason-Dosierung in mg/kg KGW**

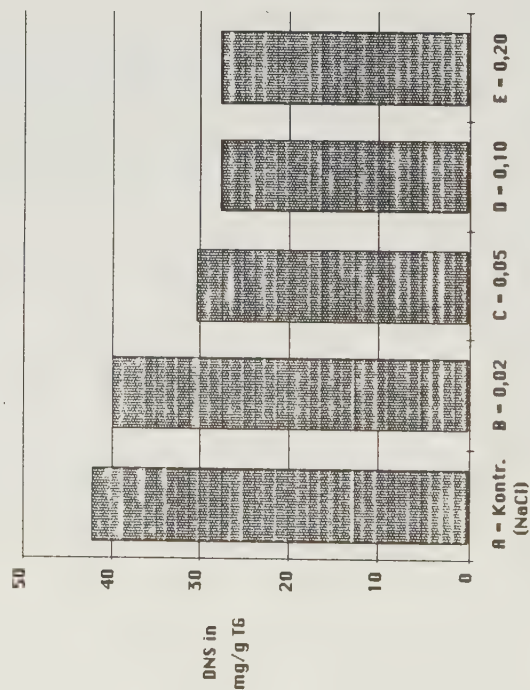
Abb. 2

Der Anteil des Dipalmitoylphosphatidylcholins (DPPC)  
in mg/g Trockengewicht (TG)



Betamethasom-Dosierung in mg/kg KGW

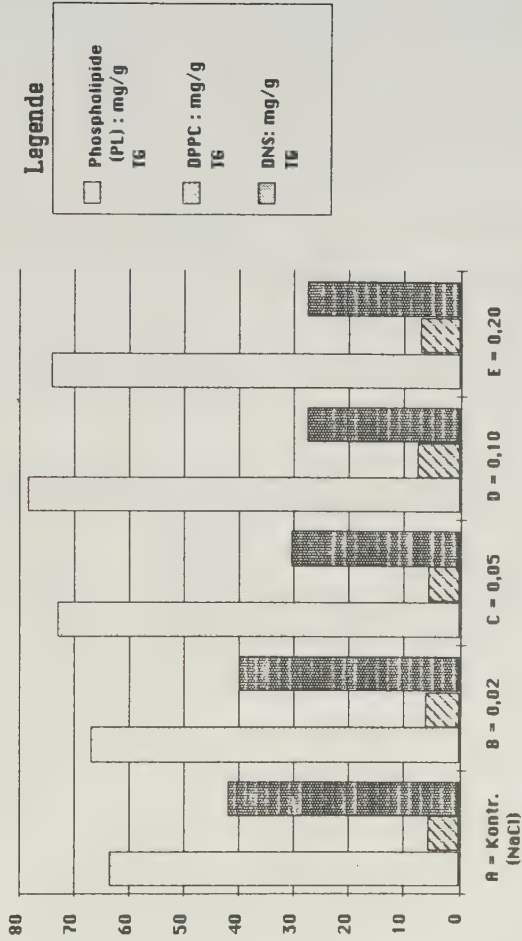
# Der Anteil der Desoxyribonucleinsäure (DNS) in mg/g Trockengewicht



Betamethason-Dosierung in mg/kg KGW

Abb. 4

# Kombinationsgrafik



## V. DISKUSSION

### V.1. Prozentanteil des Phosphatidylcholins am Gesamtphospholipid (Tab. 1)

Die Erhöhung des prozentualen PC-Anteils unter den Phospholipiden erklärt man sich durch die beschleunigte Differenzierung der Typ-II-Zellen. Wenn früher als normal eine größere produktionsfähige Anzahl Zellen vom Typ II vorhanden ist, geht man davon aus, daß auch vermehrt Phosphatidylcholin, speziell die PC-32-Spezies und davon wiederum die zweifach-gesättigte (DPPC) gefunden werden muß, da diese Zellen ja als Ursprungsort gelten. (88)

Im Falle der Carnitinbehandlung sind hingegen sämtliche Phospholipide, wie überhaupt die Lipide, vermehrt. (22)

### V.2. Prozentanteile der einzelnen Phosphatidylcholinspezies am Gesamtphosphatidylcholin (PC). (Tabelle 2)

Was die einzelnen PC-Spezies betrifft, so besitzt eigentlich nur die PC-32-Spezies spezielle Bedeutung für den Surfactant. Von den anderen PC-Spezies schreibt man allenfalls noch der PC-30-Spezies eine gewisse Beteiligung am Surfactant zu, während die PC-34-, PC-36- und die PC-38-Spezies eigentlich Membranphospholipide sind, die für den Surfactant keine Bedeutung haben, aber natürlich mit auftreten, wenn man Lungengewebe analysiert.

Wie zu erwarten ist, sieht man keine großen Unterschiede hinsichtlich der prozentualen Verteilung der einzelnen PC-Spezies, allenfalls einen kleinen Vorsprung des DPPC, der bei der Dosierung von 0,10 mg/kg KGW Betamethason sogar signifikant ist.

Von besonderem Interesse bei der Betrachtung der Unterschiede der PC-Spezies-Zusammensetzung von Fetenlungen und jener von Lungen erwachsener Tiere sind die einfach-ungesättigten PC-32-Spezies

16:0/16:1 und 16:1/16:0.

Während in der fetalen Lunge die 16:1/16:0 - Variante den Hauptanteil der PC-32 einfach-ungesättigten Spezies ausmacht, stellt sie in den Lungen adulter männlicher Ratten nur einen kleinen Anteil dar. Hier dominiert die 16:0/16:1 - Variante. (88)

Nach Betamethasonbehandlung ist weder ein Anstieg der beiden noch eine nennenswerte Verschiebung ihres Verhältnisses zueinander zu verzeichnen. Im Falle einer beschleunigten Anpassung jenes Teils des PC-Profiles der fetalen Lunge an das extrauterine Leben müßte man das aber erwarten. Ganz im Gegenteil fällt sogar die 16:0/16:1 - Variante ab der Dosierung Betamethason 0,05 signifikant ab.

So muß wohl eine mögliche Bedeutung dieser zwei Varianten für die Lungenfunktion bzw. ihre Aussagekraft über die Lungenreife noch gesichert werden.

### V.3. Der Anteil der Gesamphospholipide bezogen auf das Trockengewicht (Tab. 3)

Der signifikante Anstieg der Gesamphospholipide bezogen auf das Trockengewicht bei der mit 0,10 mg/kg KGW Betamethason behandelten Gruppe D untermauert die Annahme, daß Enzyme der Phospholipidsynthese durch Glucocorticoidgaben stimuliert werden können, vor allem die Cholinphosphotransferase, - allerdings bei weitem nicht so gut wie durch Carnitingaben, wie wir in einer parallel untersuchten Reihe mit 60,80 und 100 mg Carnitin pro Kg KGW nachweisen konnten. (22)

Vergleicht man darüberhinaus die Gruppe E (Beta 0,20) mit der Gruppe D (Beta 0,10), so fällt auf, daß hier wiederum ein signifikanter Abfall vorliegt. (Abb. 1)

Dies gilt als Zeichen dafür, daß ab einer gewissen Glucocorticoiddosis

die Enzyme, welche Phospholipide abbauen (Phospholipasen), ebenfalls stimuliert werden, was wiederum der Surfactantsynthese zum Nachteil gereicht.

#### V.4. Der Anteil des Dipalmitoylphosphatidylcholins (DPPC) bezogen auf das Trockengewicht (Tab. 4).

Wie bei den Gesamtpospholipiden ist auch hier ein signifikanter Anstieg bei der Dosierung der Gruppe D (Beta 0,10) zu verzeichnen. Auch hier wieder eine signifikante Erniedrigung bei Verdoppelung der Dosis in Gruppe E (Beta 0,20), die auf eine Stimulierung der Phospholipasenaktivität zurückgeführt wird. (Abb. 2)

Es scheint selektiv eine stärkere Erhöhung speziell des DPPC gegenüber anderen Phosphatidylcholinen und auch Phospholipiden stattzufinden.

Diese Ergebnisse stimmen überein mit der eingangs vorgestellten Theorie, daß Glucocorticoide und Carnitin auf zwei verschiedenen Wegen die Surfactantsynthese fördern.

Die Wirkung der Glucocorticoide basiert auf einer speziellen, selektiven Vermehrung durch beschleunigte Differenzierung der Typ-II-Zellen (10,103,137), während die Wirkung des Carnitins auf einer pauschalen Vermehrung aller Phospholipide durch Stimulierung des Fettsäuresynthetasekomplexes beruht. (46)

#### V.5. Der Anteil der Desoxyribonucleinsäure (DNS) bezogen auf das Trockengewicht (Tab. 5)

Die Betamethasondosis, wie sie in Gruppe C (Beta 0,05) angewendet wird, liegt nur bei etwa 20-25 % der derzeit klinisch üblichen von 0,2-0,3 mg/kg KGW (114) und bewirkt schon einen signifikanten Abfall. Bei der Dosierung in Gruppe D (Beta 0,10) ist bereits ein

signifikanter Rückgang gegenüber den Kontrollen erreicht, wie er selbst durch Verdoppelung der Dosis in Gruppe E (Beta 0,20) nicht mehr verschlimmert werden kann (Abb. 3).

Der drastische Rückgang an DNS in mg pro g Trockengewicht muß wohl als mindestens ebenso wichtiges Ergebnis dieser Untersuchung gelten, wie die Ermittlung einer möglichst geringen Betamethasondosis, die aber noch günstig auf Zelldifferenzierung und Surfactantsynthese einwirkt (Abb. 4).

Seit Jahren bestehen Bemühungen, den eigentlich bekannten und durchaus riskanten Nebenwirkungen der Glucocorticoide aus dem Wege zu gehen. Sie beschränken sich meist auf die Suche nach alternativen Substanzen, die bei weniger Nebenwirkungen möglichst die gleiche oder noch besser eine stärkere Beschleunigung der Lungenreifung bewirken sollen. So haben wir in dieser Arbeit versucht, die möglichst ungefährliche Glucocorticoiddosis herauszufinden, in einer parallel gelaufenen Arbeit (22) die nützlichste Carnitindosis.

ANDERSON et al. (3) finden einen deutlichen Anstieg in der Aufnahme von markiertem Cholin in das Phosphatidylcholin fetaler Rattenlungen, verglichen mit den Kontrolltieren, nachdem die Muttertiere am 20. Gestationstag Dosen zwischen 0,8 und 6,4 mg/kg KGW erhielten.

FUNKHOUSER and HUGHES (48) verwenden 0,4 mg/kg KGW Dexamethason und sehen einen Abfall der DNS um 51 %, des Gesamt-PC um 28% und der zweifach gesättigten PC-32-Spezies um 33%.

Zusätzlich zu den Veränderungen in der PC-Spezies-Zusammensetzung der fetalen Lungen und zu einer beschleunigten Cholinaufnahme in den

pulmonalen PC, üben Glucocorticoide auch einen Einfluß auf den Proteinmetabolismus aus.

Die Erhöhung der Gesamtpospholipide und des DPPC, bezogen auf das Trockengewicht, könnte hinsichtlich eines direkten Vergleiches zwischen der mit Betamethason behandelten Gruppe und der Kontrollgruppe durch den inhibitorischen Effekt der Steroide auf die Proteinsynthese verfälscht sein.

Über einen deutlichen Rückgang des DNS-Anteils wurde bereits berichtet. man hat ihn als Verzögerung der Lungenzellmitoserate zugunsten einer Zelldifferenzierung interpretiert.

Diese Veränderungen in den fetalen Lungen werden 24-48 Stunden nach Steroidbehandlung gefunden und als Ausdruck einer funktionellen und morphologischen Reifung der Lunge gedeutet. (35,74,82,105)

In dieser Arbeit wird der Rückgang der DNS wegen seiner schlimmen Auswirkungen auf das Zentrale Nervensystem aber auch auf andere Organe (64,80) als unerwünschte Nebenwirkung der Glucocorticoide angesehen und deshalb mitbestimmt.

In Übereinstimmung mit den morphologischen Ergebnissen (147) ist bei den Gruppen B (Beta 0,02) und C (Beta 0,05) kaum ein Unterschied zu den Kontrollen zu erkennen.

Anzuregen ist auf jeden Fall eine nochmalige, genaue histologische Untersuchung, da der Zeitpunkt dieser Probenentnahme als etwas verfrüht bezeichnet wurde. (147)

Die ersten nachweisbaren Wirkungen auch einer sehr geringen Betamethasonmenge liegen in der Reduzierung des DNS-Gehaltes. Dies könnte die Hypothese unterstützen, daß in vielen Fällen die riskanten Nebenwirkungen einer Steroidbehandlung über den Nutzen gehen.

Signifikante Veränderungen in Bezug auf den Phospholipid- und DPPC-Gehalt sind bei Gruppe D vorhanden (Abb. 1, 2 u. 4), doch muß bei dieser Dosierung schon mit beträchtlichen Nebenwirkungen gerechnet werden (Abb. 3 u. 4).

Bei Gruppe E (Beta 0,2) wird sogar deutlich, daß die Enzyme, welche Phospholipide abbauen, ebenfalls stimuliert werden.

Bei der Dosis der Gruppe E (Beta 0,2) ist gegenüber Gruppe D die Steigerung der Aktivität der Phospholipasen durch die Steroidbehandlung größer als die Steigerung der Aktivität jener Enzyme, die Phosphatidylcholin und damit auch den Hauptbestandteil des Surfactant, DPPC, synthetisieren.

Das bedeutet, daß hohe Steroidgaben sogar zu einer Verminderung von Surfactant im Lungengewebe führen können. Hier liegt auch der große Unterschied zwischen quantitativen Bestimmungen, wie in dieser Arbeit, und Untersuchungen, die den Einbau von markiertem Cholin bestimmen, wie in den Untersuchungen von ANDERSON et al. (3)

Bei diesen Arbeiten ist nämlich zu Beginn der Untersuchung nur unmarkiertes Phosphatidylcholin vorhanden. Zusammen mit den Steroiden wird  $^{14}\text{C}$ -Cholin gegeben.

Durch das Verhältnis von markiertem Phosphatidylcholin zu nicht markiertem nach einer bestimmten Zeit wird die Syntheserate des Phosphatidylcholin angegeben. Die Abbaurrate, d.h., die Phospholipaseaktivität, wird meist nicht bestimmt.

Da aber prozentual viel mehr nicht markiertes Phosphatidylcholin vorhanden ist als markiertes, wird natürlich in erster Linie nicht markiertes abgebaut.

Nach Ende des Versuchszeitraumes ist das Verhältnis markiertes Phosphatidylcholin zu nicht markiertem in Wirklichkeit die Summe

aus der Syntheserate von markiertem Phosphatidylcholin und der Abbaurate von nicht markiertem.

Es wird aber von den meisten Autoren behauptet, dies sei die Syntheserate. Bei hohen Dosierungen, wie Gruppe E (Beta 0,20) der vorliegenden Arbeit zeigt, kann die Abbaurate größer sein als die Syntheserate.

Dies ist der Grund, warum quantitative Untersuchungen andere Ergebnisse bringen als jene, die nur die Einbauraten berechnen.

Es gilt nunmehr als gesichert, daß für eine vorzeitige Differenzierung der Typ-II-Zellen geringere Betamethasondosierungen erforderlich sind, als für eine angestrebte Stimulierung der Enzyme der Phosphatidylcholinsynthese.

In die gleiche Richtung deutet die histologische Interpretation der vorliegenden Untersuchung. (147)

Da die Phosphatidylcholinsynthese viel besser mit Carnitin angeregt wird, aber nicht die vorzeitige Differenzierung, kann man die Betamethasondosis bei einer Kombinationsbehandlung auf jene Menge beschränken, die für eine vorzeitige Differenzierung der Typ-II-Zellen ausreicht.

Die vorliegenden Ergebnisse lassen erwarten, daß bei einer Kombinationstherapie eine Reduzierung der bisherigen Standarddosis von 0,2-0,3 mg/kg KGW auf jeden Fall auf 0,1 mg/kg KGW angezeigt ist.

Vielleicht genügt sogar, das werden die Kombinationsdosierungen zeigen, ein Einsatz von 0,05 mg/kg KGW Betamethason.

## VI. ZUSAMMENFASSUNG

Die derzeit noch übliche klinische Prophylaxe eines drohenden frühkindlichen Atemnotsyndroms ist die Glucocorticoidbehandlung der Mutter. In den letzten Jahren wurden kritische und zweifelhafte Stimmen hinsichtlich der nicht zu unterschätzenden Nebenwirkungen laut.

Auf der Suche nach alternativen Therapien entdeckte man, daß Glucocorticoide und Carnitin auf zwei verschiedenen Wegen die pulmonale Surfactantsynthese fördern und sich hierin günstig ergänzen.

Die Glucocorticoide sorgen für eine vorzeitige Differenzierung der Typ-II-Zellen, das Carnitin stimuliert deren Phospholipidproduktion. Das Ziel der vorliegenden Arbeit war es daher, anhand von biochemischen und morphologischen Kriterien jene Dosierung von Betamethason herauszufinden, die bei geringsten Nebenwirkungen eine vorzeitige Differenzierung der Typ-II-Zellen bewirkt.

Es wurden 55 gravide Wistarratten gegen Ende der Schwangerschaft mit absteigenden Betamethason Dosen von 0,2 mg/kg KGW bis 0,02 mg/kg KGW behandelt.

Als Kontrollgruppe dienten mit physiologischer Kochsalzlösung behandelte Ratten. Die durch Laparatomie gewonnenen Fetenlungen wurden biochemisch aufbereitet und analysiert.

Als Parameter galten:

Der Prozentanteil des Phosphatidylcholins (PC am Gesamtphospholipid, welcher eine signifikante Steigerung ( $p < 0,05$ ) von 1,7 auf 3,6 erfuhr. Die Profilzeichnung der Prozentanteile der einzelnen Phosphatidylcholinspezies am Gesamtphosphatidylcholin (PC) ist zwar erstellt worden, zeigt aber wenig Aussagekräftiges. Der Anteil der Gesamtphospholipide (PL) in mg/g Trockengewicht ist bei Gruppe D (0,1 mg/kg KGW Betamethason) signifikant erhöht. ( $p < 0,05$ ; Kontrolle: 10,4 mg/g TGW gegenüber Gruppe D: 16,4 mg/g TGW)

Der Anteil des Dipalmitoylphosphatidylcholins (DPPC) in mg/g Trockengewicht ist in der Gruppe D (0,1 mg/kg KGW Betamethason) signifikant erhöht. ( $p < 0,05$ ; Kontrolle: 0,7 mg/g TGW gegenüber Gruppe D: 2,8 mg/g TGW)

Der Anteil der Desoxyribonucleinsäure (DNS) in mg/g Trockengewicht erniedrigt sich gegenüber dem Kontrollwert ( 6,5 mg/g TGW) gemäß den aufsteigenden Dosierungen bis zu Gruppe E (0,2 mg/kg KGW Betamethason) signifikant. ( $p < 0,05$ ; Gruppe E: 5,3 mg/g TGW).

Darüberhinaus werden die Ergebnisse einer im Auftrag parallel gelaufenen histologischen Untersuchung geschildert und die morphologischen Ergebnisse mit den biochemischen verglichen.

### **Title**

Dose response effects of Bethamethasone stimulation on fetal lung maturity in the rat.

### **SUMMARY**

The current standard clinical prophylactic measure against a threatening respiratory deficiency in the newborn consists of glucocorticoid therapy to the mother. In recent years critical and concerned voices have been raised with respect to the significant side effects associated with this type of therapy.

The search for alternative treatments lead to the discovery that glucocorticoids and carnitine influence pulmonary surfactant synthesis by two different, but complementary methods.

Glucocorticoids induce the premature differentiation of Type-II-cells, whereas carnitine stimulates their production of phospholipids.

Biochemical and morphological investigations were therefore used in the present study to determine those dosages of Betamethasone which would bring about the lowest occurrence of side effects, while still achieving the premature differentiation of the Type-II-cells.

55 Wistar rats in the final stages of pregnancy were treated with decreasing dosages of Betamethasone ranging from 0.2 to 0.02 mg per kilogram of body weight.

Rats treated with physiological saline served as the control group. The fetal lungs obtained via laparotomy were biochemically prepared and analysed.

That portion of phosphatidylcholine (PC) [taken as a percentage of

total phospholipids] which experienced a significant ( $p < 0.05$ ) increase from 1.7 to 3.6 served as a parameter. A profile of each individual species of phosphatidylcholine this time taken as a percent of total phosphatidylcholine (PC) was also constructed, but was not too instructive. Both the amount of total phospholipids (PL) as well as the amount of dipalmityl-phosphatidylcholine (DPPC), each expressed in mg per gram dry weight) as follows:

|      | <b>Control</b> | <b>Group D ( 0.1 mg/kg dryweight)</b> |
|------|----------------|---------------------------------------|
| PL   | 10.4           | 16.4                                  |
| DPPC | 0.7            | 2.8                                   |

The portion of desoxy-ribonucleic-acid (DNA) decreased significantly ( $p < 0.05$ ) and anti-parallel to the increasing dosages:

| <b>Control</b> | <b>Group E (0.2 mg Betamet./kg body weight)</b> |
|----------------|-------------------------------------------------|
| 6.5            | 5.3                                             |

Morphological results were also obtained in a concomitant histological study, allowing for this comparison with the biochemical findings.

**Literaturverzeichnis**

1. ABE, M., OHNO, K., SATO, R., 1974:  
Possible identity of lysolecithin acyl-hydrolase with  
lysolecithin-lysolecithin acyl-transferase in rat lung  
soluble fraction  
Biochim. Biophys. Acta, 369: 361-369
2. AGRANOFF, B.W., HAJRA, A.K., 1971:  
The acyl dihydroxyacetone phosphate pathway for  
glycerolipid biosynthesis in mouse liver and Ehrlich  
ascites tumor cells  
Proc. Nat. Acad. Sci. USA 68: 411-415
3. ANDERSON, G.G., LAMDEN, M.P., CIDLOWSKI, J.A., ASHIKAGA, T., 1981:  
Comparative pulmonary surfactant-inducing effect of  
three corticosteroids in the near-term rat  
Obste. Gynecol. 139: 562-568
4. ARMSTRONG, H.J., KUENZIG, M.C., PELTIER, L.F., 1967  
Lung lipase levels in normal rats and rats with experimentally  
produced fat embolism  
Proc. Soc. Exp. Biol. Med., 124: 959-963
5. ASKIN, F.B., KUHN, C., 1971:  
The cellular origin of pulmonary surfactant  
Lab. Invest. 25: 260-268

6. AVERY, M.E.A., 1975  
Pharmacological approaches to the acceleration of fetal lung maturation  
Brit. Med. Bull. 31: 13-17
7. BACHMANN, K.D., 1978  
Pädiatrie in Praxis und Klinik  
Thieme, Stuttgart
8. BANGHAM, A.D., MORLEY, C.J., PHILLIPS, M.C., 1979  
The physical properties of an effective lung surfactant  
Biochim. Biophys. Acta, 573: 552-556
9. BALLARD, P.L., BALLARD, R.A., 1972  
Glucocorticoid receptors and the role of glucocorticoids in fetal lung development  
Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 69: 2668-2672
10. BARTLETT, G.R., 1959  
Phosphorus assay in column chromatography  
J. Biol. Chem. 234: 466-468
11. BATENBURG, J.J., LONGMORE, W.J., VAN GOLDE, L.M.G., 1978  
The synthesis of phosphatidylcholine by adult rat lung alveolar type II epithelial cells in primary culture.  
Biochim. Biophys. Acta 529: 160-165

12. BAXTER, J.D., FORSHAM, P.H., 1972  
Tissue effects of glucocorticoids  
Am. J. Med. 53: 573-589
13. BERGMEYER, H.U., 1974  
Methoden der enzymatischen Analyse  
Weinheim, Verlag Chemie
14. BODY, D.L., 1971  
The Phospholipid Composition of Pig Lung Surfactant.  
Lipids, 6: 411-418
15. BONGIOVANNI, A., MC FADDEN, A., 1960  
Steroids during pregnancy and possible fetal consequences.  
Fertil. Steril. 11: 181-185
16. BRANCENI, D., ARNASON, B., 1966  
Thymic involution and recovery: Immune responsiveness and  
immunoglobins after neonatal prednisolone in rats  
Immunology 10: 35-44
17. BREMER, J., GREENBERG, D.M., 1961  
Methyl transferring enzyme system of microsomes in the  
biosynthesis of lecithin (phosphatidylcholine)  
Biochim. Biophys. Acta 46: 205-216
18. BREMER, J., 1977  
Carnitine and its role in fatty acid metabolism  
TIBS September 207: 162-166

19. BUCKINGHAM, S., AVERY, M.E., 1962  
The time of appearance of lung surfactant in the fetal mouse.  
Nature, 193: 688-689
20. BUCKINGHAM, S. MC. NARY, W.F., SOMMERS, S.C., 1968  
Is lung an analog of Moog's developing intestine;  
Phosphatases and pulmonary alveolar differentiation in fetal rabbits  
Fed. Proc. 27: 328-331
21. BUDDECKE, E., 1977  
Grundriß der Biochemie  
Walter de Gruyter, Berlin-New York
22. BÜTHE, K.  
Vet. Med. Diss., München in Vorbereitung
23. CARSON, S., TAEUSCH, H.W. jr. and AVERY, M., 1973  
Inhibition of lung cell division after hydrocortisone injection into fetal rabbits  
J. Appl. Physiol. 34: 660-663 (1973)

24. CHEVALIER, G., COLLET, A.J., 1972  
In vivo incorporation of choline -  $^3\text{H}$ , leucine -  $^3\text{H}$  and  
galaktose -  $^3\text{H}$  in alveolar Typ II pneumocytes in relation to  
surfactant synthesis: A quantitative radioautographic study  
in mouse by electron microscopy.  
Anat. Rec. 174: 289-310
25. CLEMENTS, J.A., 1975  
Surface tension of lung extracts  
Proc. Soc. Exp. Biol. Med., 95: 170-173
26. CLEMENTS, J.A., 1967  
The alveolar lining layer. In: Ciba Foundation Symposium:  
Development of the lung, edited by A.V.S. de Reuck and R.  
Porter, London: Churchill 202-221
27. CLEMENTS, J.A., KING, R.J., 1976  
The biochemical basis of pulmonary function  
In: The biochemical basis of pulmonary function  
Crystal, R.G., ed., Dekker, New York 363-387
28. CLEMENTS, J.A., 1977  
Functions of the alveolar lining  
Am. Rev. Resp. Dis. 115: 67-71

29. COLACICCO, G., RAY, A.K., BUCKELEW, A.R. jr., 1977  
Pulmonary Surfactant: Distribution of Lipids, Proteins and Surface Activity in Ultracentrifugation of Rabbit Pulmonary Washing and Derived Fractions.  
Lipids 12: 367-371
30. COTTERRELL, M., BALAZS, R., JOHNSON, A., 1972  
Effects of corticosteroids on the biochemical maturation of rat brain postnatal cell formation.  
J. Neurochem. 19: 2151-2167
31. COWAN, M.J., 1974  
Workshop on possible pharmacologic mechanisms for enhancement of lung maturation  
Am. Rev. Respir. Dis. 110: 329-332
32. CUESTAS, R. A., LINDALL, A., ENGEL, R.R., 1976  
Low thyroid hormones and respiratory-distress syndrome of the newborn. Studies on cord blood.  
New Engl. J. Med. 3: 295-297
33. CURTI, P.C., 1974  
Therapeutische Untersuchungen mit Metabolit VIII von Bromhexin bei mangelhafter oberflächenaktiver Substanz der Alveolen.  
Arzneim. Forsch. (Drug Res.) 24: 847-849

34. DAHME, E., WEISS, E., 1978  
 Grundriß der speziellen pathologischen Anatomie der  
 Haustiere  
 Ferdinand Enke Verlag, Stuttgart
  
35. DE LEMOS, R.A., SHERMETA, D.W., KNELSON, J.H., KOTAS, R.,  
 AVERY, M.E., 1970  
 Acceleration of appearance of pulmonary surfactant in the  
 fetal lamb by administration of corticosteroids.  
 Am. Rev. Respir. Dis. 102: 459-461
  
36. DICKIE, K., MASSARO, D., 1974  
 Protein transport by lung  
 Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 145: 154-156
  
37. ECKERT, H., GERNER, R., SCHULZ, J., WERNICKE, K., V. LÖWENICH,  
 HALBERSTADT, E., 1975  
 Beeinflussung der fetalen Lungenreife durch Kortikoide.  
 Archiv. Gynäk. 219: 331-333
  
38. EKELUND, L., AROIDSON, G., ASTEDT, B., 1975  
 Cortisol-induced accumulation of phospholipids in organ  
 culture of human fetal lung  
 Scand. J. Clin. Lab. Invest. 35: 419-423
  
39. ENGLE, M.J., SANDERS, R.L., LONGMORE, W.J., 1976  
 Phospholipid Composition and Acyltransferase Activity of  
 Lamellar Bodies Isolated from Rat Lung.  
 Arch. Biochem. Biophys. 173: 586-595

40. ENHORNING, G. CHAMBERLAIN, D., CONTRERAS, C., BURGOGNE, R.,  
ROBERTSON, B., 1979  
Isoxsuprine infusion to the pregnant rabbit and its effect  
on fetal lung surfactant  
Biol. Neonate 35: 43-45
  
41. ERHARDT, W., ZÄNKER, K., TÖLLE, W., WRIDT-LÜBBE J., PROBST, J., 1977  
Experimentelle Untersuchungen zur Pathogenese der akuten  
pulmonalen Insuffizienz.  
Res. Exp. Med. 171: 163-172
  
42. FACKET, J., PALKOVITS, M., VALLENT, K., STARK, E., 1966  
Effect of a single glucocorticoid injection on the first day  
of life in rats  
Acta Endocrinol. (KBH) 51: 71-73
  
43. FARRELL, P. M., AVERY, M.E., 1975  
Hyaline Membrane Disease  
Am. Rev. Resp. Dis. 111: 657-688
  
44. FRANSON, R., BECKERDITE, S., WANG, P., WAITE, M., ELSBACH, P., 1973  
Some properties of phospholipases of alveolar macrophages  
Biochim. Biophys. Acta, 296: 365-367
  
45. FRANSON, R., WAITE, M., 1973  
Lysosomal phospholipases A<sub>1</sub> and A<sub>2</sub> of normal and Bacillus  
Calmette Guérin-induced alveolar macrophages  
J. Cell Biol., 56: 621-627

46. FRITZ, J.B., 1963  
Carnitine and its role in fatty acid metabolism  
Adv. Lipid Res. 1: 285-294
  
47. FROSOLONO, M.F., CHARONS, B.L., PAWLOWSKI, R., SLIVKA, S., 1970  
Isolation, characterization and surface chemistry of a  
surface active fraction from dog lungs  
J. Lipid Res. 11: 439-457
  
48. FUNKHOUSER, J.D., HUGHES, E.R., 1980  
Fetal lung disaturated phosphatidylcholine.  
Ostensible increase following exposure to dexamethasone  
Biochim. Biophys. Acta 619: 509-514
  
49. GALLAI-HATCHARD, J.J., THOMPSON, R.H.S., 1972  
Phospholipase-A activity of mammalian tissues  
Biochim. Biophys. Acta, 280: 552-555
  
50. GARCIA, A., NEWKIRK, J.D., MAVIS, R.D., 1975  
Lung surfactant synthesis: A  $\text{Ca}^{2+}$ - dependent microsomal  
phospholipase A2 in the lung  
Biochem. Biophys. Res. Commun. 64: 128-131
  
51. GERNER, R., HALBERSTADT, E., FORTMEYER, H.-P., 1976  
In vivo und in vitro Untersuchungen zur Wirkung von  
Decortilen (16-Methylenprednisolon) auf die Lecithinsynthese der  
fetalen Lunge.  
Z. Geburtsh. Perinat. 180: 183-188

52. GERNER, R., HALBERSTADT, E., 1976  
Tierexperimentelle Untersuchungen zur Frage der optimalen  
Synthesestimulierung des Lecithins in der fetalen Lunge  
durch Glucocorticoide  
Z. Geburtsh. Perinat. 180: 189-193
53. GIL, J., REISS, O.K., 1973  
Isolation and characterization of lamellar bodies and  
tubular myelin from rat lung homogenates.  
J. Cell Biol. 58: 152-171
54. GLAUBACH, S., ANTROPOL, W., GROFF, S., 1951  
Excessive doses of cortisone in pregnant mice: Effect on  
development and survival of the fetus and newborn and on  
maternal breast tissue  
Bull. N.Y. Acad. Med. 27: 398-402
55. GOLD, D.V. and SHOCHAT, D., 1980  
A rapid colorimetric assay for the estimation of microgram  
quantities of DNA  
Analytical Biochemistry 105: 121-125
56. GREEN, O., 1965  
Steroid metabolism in the fetus and newborn infant  
Pediatr. Clin. North Am. 12: 615-619

57. GUMBINAS, M., ODA, M., HUTTENLOCHER, P., 1973  
The effects of corticosteroids on myelination of the  
developing rat brain  
Biol. Neonat. 22: 255-259
58. HARBHAJAN, S.P., ADIBI, S.A., 1978  
Effect of carnitine on branched chain amino acid oxidation  
by liver and skeletal muscle  
Am. J. Physiol. 234: 494-498
59. HARWOOD, J.L., DESAI, R., HEXT, P., TETLEY, T., RICHARDS, R., 1975  
Characterization of pulmonary surfactant from ox, rabbit,  
rat and sheep  
Biochem. J. 151: 707-714
60. HAYDEN, W., OLSON, E.B., ZACHMAN, R.D., 1977  
Effect of maternal isoxsuprine on fetal rabbit lung  
biochemical maturation.  
Am. J. Obstet. Gynecol. 129: 691-695
61. HENDERSON, R.R., PFLEGER, R.C., 1972  
Surface tension studies of phosphatidylglycerol isolated  
from the lungs of beagle dogs  
Lipids 7: 492-494

62. HINZ, H.J., STURDEVANT, J.M., 1972  
Colorimetric investigation of the influence of cholesterol  
on the transition properties of bilayers formed from  
synthetic 1-2-lecithins in aqueous suspension.  
J. Biol. Chem. 247: 3697-3700
63. HOWARD, E., 1968  
Reduction in size and total DNA of cerebrum and cerebellum  
in adult mice after corticosterone treatment in infancy  
Exp. Neurol. 22: 191-194
64. HOWARD, E., GRANOFF, D., 1968  
Increased voluntary running and decreased motor  
co-ordination in mice after neonatal corticosterone  
implantation  
Exp. Neurol. 22: 661-667
65. HÜTTER, W., 1981  
Die Beeinflussung der fetalen Lungenreife durch Thyroxin.  
Med. Diss. Technische Universität München
66. KANJANAPONE, V., HARTIG-BECKEN, J., EPSTEIN, M.P., 1980  
Effect of isoxsuprine on fetal lung surfactant in rabbits  
Pediatr. Res. 15: 278-287
67. KEUTH, U., 1965  
Das Membransyndrom der Früh- und Neugeborenen.  
Springer Verlag, Berlin-Heidelberg-New York

68. KEUTH, U., 1970  
Das Atemnotsyndrom (Membransyndrom) und seine  
Behandlung  
Mschr. Kinderheilk. 118, 52-56
69. KING, R.J., CLEMENTS, J.A., 1972  
Surface active materials from dog lung II.  
Composition and physiological correlations.  
Am. J. Physiol. 223: 715-726
70. KING, R.J., KLASS, D.J., GIKAS, E.G., CLEMENTS, J.A., 1973  
Isolation of apoproteins from canine surface active  
material.  
Am. J. Physiol. 224: 788-795
71. KING, R.J., 1974  
The surfactant system of the lung  
Fed. Proc. 33: 2238-2247
72. KING, R.J., 1979  
Utilization of alveolar epithelial Typ II cells for the study  
of pulmonary surfactant  
Fed. Proc. 38: 2637-2643
73. KING, R.J., MACBETH, M.C., 1979  
Physicochemical properties of  
Dipalmitoylphosphatidylcholine after Interaction with an  
Apolipoprotein of Pulmonary Surfactant.  
Biochim. Biophys. Acta, 557: 86-101

74. KLASS, D.T., 1973  
Immunochemical studies of the protein fraction of  
pulmonary surface active material.  
Am. Rev. Resp. Dis. 107:784-789
75. KOTAS, R., AVERY, M., 1971  
Accelerated appearance of pulmonary surfactant in the  
fetal rabbit  
J. Appl. Physiol. 30: 358-361
76. KOTAS, R.V., MIMS, L.C., HART, L.K., 1974  
Reversible inhibition of lung cell number after glucocorticoid  
injection into fetal rabbits to enhance surfactant appearance.  
Pediatrics 53: 358-361
77. KRIEGLSTEINER, P., 1976  
Prüfung der antepartalen Lungenreife  
Habilitationsschrift an der Fakultät für Medizin der  
Technischen Universität München
78. KRIEGLSTEINER, P., LOHNINGER, A., MÜNNICH, W., NEISS, A.,  
BLÜMEL, G., 1978  
Pharmakologische Beeinflussung der fetalen  
Phospholipidsynthese. Teil I: Effekt von Betamethason und  
Bromhexin-Metabolit VIII (Ambroxol<sup>R</sup>)  
Z. Geburtsh. Perinat. 182: 16-28

79. KUSS, E., 1976  
Biochemie und Präpartale Diagnostik der Lungenreifung  
J. Clin. Chem. Clin. Biochem. 14: 505-513
80. LEE, J., RING, P., 1956  
The effect of maternally administered cortisone and ACTH  
upon the pancreas of the fetus.  
J. Endocrinol. 14: 284-287
81. LIGGINS, G.C., 1969  
Premature Delivery of Foetal Lambs infused with  
Glucocorticoids  
J. Endocr. 45: 515-522
82. LIGGINS, G.C., HOWIE, R.N., 1972  
A controlled trial of antepartum glucocorticoid treatment  
for prevention of the RDS in premature infants  
Pediatrics 50: 515-525
83. LIPSHITZ, J., BROYLES, K., HESSLER, J.R., WHYBREW, W.D., AHOKAS, R.A.,  
ANDERSON, G.D., 1981  
Effects of hexoprenaline on the L/S-ratio and pressure  
volume relationships in fetal rabbits  
Am. J. Obstet. Gynecol. 139: 726-732
84. LÖFFLER, G., WEISS, L. PETRIDES, P.E., HARPER, H.A., 1979  
Physiologische Chemie  
Springer Verlag, Berlin-Heidelberg-New York

85. LOHNINGER, A., KRIEGLSTEINER, P., RIEDL, W., ERHARDT, W.,  
BLÜMEL, G., 1978  
Pharmakologische Beeinflussung der fetalen  
Phospholipidsynthese  
Z. Geburtsh. Perinat. 182: 29-37
86. LOHNINGER, A., NIKIFOROV, A., 1980  
Quantitative determination of natural dipalmitoyl lecithin  
with dimyrystoyl lecithin as internal standard by capillary  
gas-liquid chromatography  
J. Chromatogr. 192: 185-192
87. LOHNINGER, A., KRIEGLSTEINER, P., FISCHBACH, F., SALZER, H., 1981  
Reduzierung der Steroiddosis zur RDS-Prophylaxe durch  
Kombination mit L-Carnitin  
Ref. IX. Akad. Tagung deutschsprachiger Hochschullehrer.  
In: Gynäkologie und Geburtshilfe S. 199-203
88. LOHNINGER, A., KRIEGLSTEINER, P., NIKIFOROV, A., ERHARDT, W.,  
SPECKER M., MARTIN, G., KAISER, E., 1984  
Comparison of the Effects of Betamethasone and  
L-Carnitine on Dipalmitoylphosphatidylcholine Content and  
Phosphatidylcholine Spezies Composition in Fetal Rat Lungs  
Pediatri. Res. 18: 1246-1252

89. LOPES-CARDOZO, M., KLAZINGA, W., VAN DEN BERGH, S., 1978  
 Accumulation of carnitine esters of  $\beta$ -oxidation  
 intermediates during palmitate oxidation by rat-liver  
 mitochondria.  
 Eur. J. Biochem. 83: 629-634
  
90. LORENZ, U., RÜTTGERS, H., FUX, G., KUBLI, F.:  
 Fetal pulmonary surfactant induction by bromhexine  
 metabolit VIII  
 Am. J. Obstet. Gynec. 119: 1126-1128
  
91. LORENZ, U., H. RÜTTGERS, FROMME, M., KUBLI, F., 1975  
 Significance of amniotic fluid phospholipid determination  
 for the prediction of neonatal respiratory distress  
 syndrome  
 Z. Geburtsh. Perinat. 179: 101-111
  
92. LORENZ, U., RÜTTGERS, H., SCHENK, D., BIERHALTER, G., KUBLI, F., 1975  
 Induction der Surfactant-Bildung der fetalen Lunge durch  
 Bromhexine Metabolit VIII  
 Arch. Gynaek. 219: 333-334
  
93. MACKLIN, C.C., 1954  
 The pulmonary alveolar mucoid film and the pneumocytes  
 Lancet 1: 1099-1104

94. MARKWELL, M.A., MC GROARTY, E.J., BIEBER, L.L., TOLBERT, N.E., 1973  
The subcellular distribution of carnitine acyltransferases  
in mammalian liver and kidney.  
J. Biol. Chem. 248: 3426-3431
95. MASON, R.J., 1976  
Lipid metabolism  
In: The Biochemical Basis of Pulmonary Function, ed. by R. G.  
Crystal, New York: Dekker, P. 127-169
96. METCALFE, I. LEROY, ENHORNING, G., POSSMAYER, F., 1980  
Pulmonary surfactant-associated proteins: their role in the  
expression of surface activity.  
J. Appl. Physiol. 49: 34-41
97. MORGAN, T.E., 1971  
Pulmonary Surfactant  
New Engl. J. Med., 284: 1185-1193
98. MOTOYAMA, E., ORZALES, M., KIKKAWA, Y., KAIBARA, M., WU, B., ZIGAS,  
C., COOK, C., 1971  
Effect of cortisol on the maturation of fetal rabbit lungs  
Perdiatrics 48: 547-555
99. NAIMARK, A., 1973  
Cellular dynamics and lipid metabolism in the lung  
Fed. Proc., 32: 1967-1971

100. OHTA, M., HASEGAWA, H., OHNO, K., 1972  
Calcium independent phospholipase A<sub>2</sub> activity in rat lung  
supernatant  
Biochim. Biophys. Acta, 280: 552-556
101. ONCLEY, J.L., HARVIE, N.R., 1969  
Lipoproteins - a current perspective of methods and  
concepts  
Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 64: 1107-1118
102. PACIGA, I.E., SHELLEY, S.A., BALIS, I.U., 1980  
Secretory IgA is a component of rabbit lung surfactant  
Biochim. Biophys. Acta, 631: 487-494
103. PATTLE, R.E., 1955  
Properties, functions and origin of the alveolar lining layer  
Nature, 175: 1125-1126
104. PFLEGER, R.C., THOMAS, H.G., 1971  
Beagle Dog Pulmonary Surfactant Lipids  
Arch. Intern. Med. 127: 863-872
105. PICKEN, J.J., LURIE, M., KLEINERMAN, J., 1975  
Prolonged glucocorticoid treatment in the rat: Effects on  
pulmonary morphology, ultrastructure and elastic  
properties.  
Chest 67: 48-52

106. PLATZKER, A.C.G., KITTEMAN, I.A., CLEMENTS, J.A., TOOLEY, W.H., 1972  
Surfactant Appearance and Secretion in fetal lamb lung in  
response to dexamethasone  
Ped. Res. 406: 146-150
107. REYNOLDS, E.O.R., ROBERTSON, N.R.C., WIGGLESWORTH, J.S., 1968  
Hyaline membrane disease, respiratory distress and  
surfactant deficiency.  
Pediatrics 42: 758-762
108. ROONEY, S.A., CANAVAN, P.M., MOTOYAMA, E.K., 1974  
The identification of phosphatidylglycerol in the rat,  
rabbit, monkey and human lung.  
Biochim. Biophys. Acta 360: 56-62
109. ROONEY, S.A., GOBRAN, L., WAI-LEE, T.S., NARDONE, L.L., MOTOYAMA,  
E.K., 1976  
Studies on pulmonary surfactant. Effects of cortisol  
administration to fetal rabbits on lung phospholipid  
content, composition and biosynthesis  
Biochim. Biophys. Acta 450: 121-130
110. ROONEY, S.A., GOBRAN, L.J., MARINO, P.A., MANISALCO, W.M.,  
GROSS, J., 1979  
Effects of betamethasone on phospholipid, content,  
composition and biosynthesis in the fetal rabbit lung  
Biochim. Biophys. Acta 572: 64-76

111. ROONEY, S.A., WAI-LEE, T.S., GOBRAN, L., MOTOYAMA, E.K., 1976  
Phospholipid Content, Composition and Biosynthesis during  
Fetal Lung Development in the Rabbit  
Biochim. Biophys. Acta 431: 447-458 110.
112. RUDOLPH, A.J., DESMOND, M.M., PINEDA, R.G., 1966  
Clinical diagnosis of respiratory difficulty in the newborn  
Pediat. Clin. N. Amer. 13: 669-672.
113. RUSSEL, B. J., NUGENT, L., CHERNICK, V., 1974  
Effects of steroids on the enzymatic pathways of lecithin  
production in fetal rabbits.  
Biol. Neonate 24: 306-314
114. SALZER, H., HUSSLEIN, P., LOHNINGER, A., BINSTORFER, E., LANGER, M.,  
SCHÖNBAUER, M., WAGNER, G., SIMBRUNER, G., POPOW, CH.,  
1983  
Erste Mitteilung: Alternativen zur Cortisontherapie. Erste  
klinische Erfahrungen mit einer  
Carnitin-Betamethason-Kombination zur Stimulation der  
fetalen Lungenreife  
Wien. Klin. Wschr. 14: 724-728
115. SAMANO, S., ARIMURA, A., SCHALZ, A., REDDING, T., SCHAPIRO, S., 1969  
Neonatal corticoid administration: Effects on adult  
pituitary growth hormone and hypothalamic releasing  
activity.  
Acta Endocrinol. (KBH) 61: 57-61

116. SANDERS, R.L., LONGMORE, W.J., 1975  
Phosphatidylglycerol in rat lung II.  
Comparison of occurrence, composition and metabolism in  
surfactant and residual lung fractions  
Biochemistry, 14: 835-839
117. SCARPELLI, E.M., 1968  
The surfactant system of the lung  
Lea and Febiger, Philadelphia
118. SCHAPIRO, S., 1965  
Neonatal cortisol administration: Effect on growth, the  
adrenal gland and pituitary-adrenal response to stress  
Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 120: 771-775
119. SCHAPIRO, S., 1968  
Some physiological, biochemical and behavioral consequences of  
neonatal hormone administration: Cortisol and thyroxine.  
Gen. Comp. Endocrinol. 10: 214-228
120. SCHAPIRO, S., SALAS, M., VUKOVICH, K., 1970  
Hormonal effects on the ontogeny of swimming ability in  
the rat: Assessment of CNS development  
Science 168: 147-151
121. SCHLESINGER, M., MARK, R., 1964  
Wasting disease induced in young mice by cortisol acetate  
administration.  
Science 143: 965-969

122. SCHÖBER, I.G., 1975

Risikoneugeborene, Atmung, Kreislauf und ihre pharmakologische  
Beeinflussung

Urban und Schwarzenberg, München-Berlin-Wien

123. SCHÖNBERGER, W., GRIMM, W., GEMPP, W., EMMERICH, W., 1981

Reduction of Mortality Rate in Premature Infants by  
Substitution of Thyroid Hormones

Eur. J. Pediatr. 135: 215-219

124. SCHWENZEL, W., JUNG, H., 1975

Pränatale Behandlungsmethoden zur Vermeidung eines  
Atemnotsyndroms bei frühgeborenen Kindern.

Gynäkologe 8: 198-205

125. SERENI, F., 1968

Effects of steroids

XII. Int. Congr. Pediatr. 1: 299-304

126. SINGLETON, E.B., 1967

Respiratory distress syndrome

In: Progress in pediatric radiology Vol. I Karger, Basel, New  
York

127. SMITH, B.T., THORDAY, J.S., GIROUD, C.J.P., 1973

The growth promoting effect of cortisol on human fetal  
lung cells

Steroids 22: 515-519

128. SMITH, B.T., THORDAY, J.S., GIROUD, C.J.P., 1974  
Evidence for different gestation-dependent effects of  
cortisol on cultured fetal lung cells  
Clin. Invest. 53: 1518-1526
129. SPELLACY, W.N., W.C. BUHI, V.C., RIGALL, K.L., HOLSINGER, 1973  
Human amniotic fluid lecithin/sphingomyelin ratio changes  
with estrogen or glucocorticoid treatment.  
Am. J. Obstet. Gynec. 115: 216-218
130. SPITZER, H.L., NORMAN, J.R., 1971  
The biosynthesis and turnover of surfactant lecithin and  
protein  
Arch. Intern. Med., 127: 429-435
131. TAEUSCH, H.W., CARSON, S.H., WANG, N.S., AVERY, M.E., 1973  
Heroin Induction of lung maturation and growth retardation  
J. Pediatr. 82: 869-875
132. TAEUSCH, H.W., 1975  
Glucocorticoid prophylaxis for respiratory distress  
syndrome.  
A review of potential toxicity  
J. Pediatr. 87: 617-623

133. TAO, R.C., YOSHIMURA, N.N., 1980  
Carnitine metabolism and its application in parenteral  
nutrition.  
IPEN 4: 469-473
134. TIERNEY, D.F., CLEMENTS, J.A., TRAHAN, H.J., 1967  
Rates of replacement of lecithins and alveolar instability  
in rat lungs  
Am. J. Physiol. 213: 671-676
135. TOMKINS, G.M., MARTIN, D.W. jr., 1970  
Hormones and gene expression.  
Am. Rev. Genet. 4: 91-95
136. VAN DEN BOSCH, H., BONTE, H., VAN DEENEN, L.L.M., 1965  
On the anabolism of lysolecithin  
Biochim. Biophys. Acta, 98: 648-652
137. VAN GOLDE, L.M.G., 1973  
Metabolism of phospholipids in the lung  
Am. Rev. Respir. Dis. 114: 997-1000
138. VAN RENSBURG, S.I., 1967  
Gestation in sheep after fetal adrenalectomy and cortisol  
acetate administration  
J. Endocr. 38: 83-84

139. WANG, N.S., KOTAS, R.V., AVERY, M.E., THURLBECK, W.M., 1971  
Accelerated appearance of osmiophilic bodies in fetal lung  
following steroid injection.  
J. Appl. Physiol. 30: 362-365
140. WARRELL, D., TAYLOR, R., 1968  
Outcome for the fetus of mothers receiving prednisolone  
during pregnancy.  
Lancet I: 117-121
141. WEBER, E., 1980  
Grundriß der biologischen Statistik  
Gustav Fischer Verlag, Stuttgart, 8. Auflage
142. WELLMAN, K., VOLK, B., 1972  
Fine structure changes in the rabbit placenta induced by  
cortisone  
Arch. Pathol. 94: 147-151
143. WINICK, M., 1968  
Cellular growth of the fetus and placenta, In: Waisman, H.  
and Kerr, G. editors:  
Fetal growths and development  
New York, Mc. Graw-Hill Book Company Inc. S. 19-24
144. WOLFF, I., MÜLLER, D.M., STRACK, E., 1971  
Die Toxizität von L-Carnitin und einigen Acylcarnitinen  
Acta Biol. Med. Germ. 26: 1237-1243

145. WONG, M., BURTON, A.F., 1971

Inhibition by corticosteroids of glucose incorporation into  
fetuses of several strains of mouse

Biol. Neonate 18: 146-151

146. WU, B., KIKKAWA, Y., ORZALES, M.M., MOTOYAMA, E.K., KAIBARA, M.,  
ZIGAS, C.J., COOK, C.D., 1973

The effect of thyroxine on the maturation of fetal rabbit  
lungs

Biol. Neonate 22: 161-168

147. Böck, P.

Histologische Untersuchungen zur Lungenreife bei der Ratte  
(unveröffentlicht).



## **Danksagung**

Herrn Priv.-Doz. Dr. med vet. Dr. med. habil. Wolf Erhardt danke ich für die Überlassung des Themas, seine Unterstützung und seine kritischen Anregungen bei der Durchführung der Arbeit.

Herrn Prof. Dr. med. vet. K. Walser gilt mein besonderer Dank für seine jederzeit bereitwillige und entgegenkommende Hilfe.

Ich danke auch Herrn Prof. Dr. med. G. Blümel für die Bereitstellung des Arbeitsplatzes sowie seinen Mitarbeitern.

Ebenfalls bedanke ich mich bei Herrn Prof. Dr. K. Osterkorn für die Hilfe bei den statistischen Berechnungen meiner Ergebnisse.



## LEBENS LAUF

Am 12. April 1953 wurde ich, Klaus Witt, als Sohn von Gunda Witt, geb. Pötzing, und Josef Witt in Fürth geboren.

Von 1959 bis 1964 besuchte ich die Volksschule an der Friedrich-Ebert-Straße in Fürth.

Anschließend folgten 9 Jahre Gymnasialzeit am Humanistischen Gymnasium in Fürth (heute: Heinrich-Schliemann-Gymnasium), die ich 1973 mit der Allgemeinen Hochschulreife abschloß.

Nach einer 3jährigen Wartezeit begann ich das Studium der Tiermedizin im Wintersemester 1976/1977 an der Tierärztlichen Fakultät der Ludwig-Maximilians-Universität in München. Nach Abschluß des Staatsexamens im Oktober 1981 wurde mir im November dieses Jahres die Approbation erteilt.

Es folgte ein Jahr als Assistenz-Tierarzt. Danach begann ich im November 1982 mit den Untersuchungen zu vorliegender Arbeit.

Seit Februar 1984 bin ich als praktischer Tierarzt in Fürth niedergelassen.









